

Pityriasis versicolor und Tyrosinaseinhibitoren

Gerhard Scheck

Diss
München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0066

Aus der dermatologischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Otto Braun-Falco

Pityriasis versicolor und Tyrosinaseinhibitoren

Inaugural Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerhard Scheck

aus
Stuttgart

Jahr
1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.2.1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1 - 2
Aetiologie	3 - 4
Fragestellung	5
Material und Methoden	6 - 14
I. Lipidextraktion aus Hornlamellen von Pityriasis-versicolor-Läsionen und normaler Haut	6 - 7
Wässrige Extraktion	6 - 7
Ätherextraktion und Auftrennung der Extrakte in eine hydrophobe und hydrophile Fraktion	7
II. Kultivierung von Pityrosporum orbiculare und Pityrosporum ovale in vitro	8 - 11
Pilze	8
Feste Nährböden	8
Kultivierung von Pityrosporum- Hefen auf festen Nährböden	9
Flüssigmedien	9
Kultivierung von Pityrosporum- Hefen in Flüssigmedien	10
Auftrennung der Lipide	11
III. Hemmung der Tyrosinase durch Reinsubstanzen	12
A. Lipidsubstrate	12
B. Gesättigte Carbonsäuren	12
C. Gesättigte Dicarbonsäuren	12

	Seite
DOPA-Tyrosinase-Reaktion	13
I. DOPA-Tyrosinase-Reaktion bei Lipidextraktion aus Hautschuppen von Pityriasis-versicolor-Läsionen und normaler Haut	13
II. DOPA-Tyrosinase-Reaktion mit Flüssigmedien und Lipidfraktionen nach einundzwanzigtägiger Kultivie- rung von Pityrosporum-Hefen	14
III. DOPA-Tyrosinase-Reaktion mit Lipidsubstraten, Carbonsäuren und Dicarbonsäuren	14
Ergebnisse	15 - 42
I. Lipidextraktion aus Hornlamellen von Pityriasis-versicolor-Läsionen und normaler Haut	15 - 21
Wässrige Extraktion	15
Ätherextraktion und Auftrennung in eine hydrophobe und hydrophile Fraktion	15
Abbildung 1 - Abbildung 4	17 - 21
II. Kultivierung von Pityrosporum orbiculare und Pityrosporum ovale in vitro	22 - 33
Prüfung der Nativmedien auf Tyrosinasehemmung	22 - 23
Flüssigmedium A1	22
Flüssigmedium A2	22
Flüssigmedium B	22
Flüssigmedium C	22 - 23
Prüfung der hydrophilen Fraktion der Kulturmedien auf Tyrosinase- hemmung	23 - 24
Flüssigmedium A1	23
Flüssigmedium A2	23 - 24
Flüssigmedium B	24
Flüssigmedium C	24
Abbildung 5 - Abbildung 13	25 - 33

	Seite
III. Hemmung der Tyrosinase durch Reinsubstanzen	34 - 42
A. Lipidsubstrate	34
B. Gesättigte Carbonsäuren	34
C. Gesättigte Dicarbonsäuren	35
Abbildung 14 - Abbildung 18	36 - 42
Diskussion	43 - 52
Zusammenfassung	53 - 54
Literaturhinweise	55 - 58
Lebenslauf	59

EINLEITUNG

Die Pityriasis versicolor ist eine oberflächliche, bevorzugt im oberen Rumpfbereich lokalisierte, Dermatomykose. In typischer Ausprägung wird die Erkrankung durch maculöse Läsionen, die mit feinen Schuppen bedeckt sind, gekennzeichnet. Klinisch charakteristisch ist dabei das "Hobelspanphänomen". Wird mit einem Holzspatel kräftig über ein befallenes Hautareal gestrichen, so lassen sich in der Mehrzahl der Fälle, hobelspanartig geformte Hornlamellen ablösen. Die meist pfennig- bis markstückgroßen Effloreszenzen können besonders an Brust und Rücken zu größeren Flächen konfluieren. Schleimhäute und talgdrüsenfreie Gebiete der Haut werden bei Pityriasis versicolor nicht befallen, da die Existenz der Mykose vom Vorhandensein eines Stratum corneum und einer ausreichenden Menge an Lipiden abhängig ist. Bevorzugt befallen werden feuchte Hautstellen, besonders an Brust und Rücken. Andere Hautareale können aber auch befallen werden. Lediglich die Handinnenflächen und die Fußsohlen werden nicht befallen, da hier keine Talgdrüsen vorhanden sind. Sowohl Männer als auch Frauen erkranken, so daß eine besondere Geschlechtsspezifität nicht besteht. Heranwachsende und Erwachsene im Alter zwischen 15 und 40 Jahren erkranken an Pityriasis versicolor besonders häufig, während Kinder und alte Menschen wesentlich seltener erkranken. Der Beginn der Erkrankung ist häufig schwierig festzustellen, da die Mykose keinerlei subjektive Beschwerden macht und erst die kosmetisch störenden größeren Pigmentveränderungen dem Patienten auffallen. Die primäre Effloreszenz entsteht meist um eine oder mehrere Follikelöffnungen und vergrößert sich langsam durch exzentrisches Wachstum. Durch Konfluenz mehrerer Herde können dann größere Flächen entstehen.

Unbehandelt kommt es zu einer Persistenz der Mykose und Spontanheilungen wurden bisher nicht beobachtet. Besonders auffällig ist bei der Erkrankung, daß bei Ultraviolettbestrahlung die Bräunung der erkrankten Hautflächen ausbleibt. Die Pilzläsionen fallen dann gegenüber der normal gebräunten Haut als weiße Flächen auf (1,7). Diese Hypopigmentierung nach Ultraviolettbestrahlung ist neben dem Hobelspanphänomen ein typisches Zeichen der Pityriasis versicolor. Mit einem Ultraviolettfiltereffekt der infizierten Hornschichten wurde dieser Befund zunächst erklärt. Klinische Beobachtungen und die Ergebnisse experimenteller Untersuchungen sprechen jedoch dafür, daß bei Pityriasis versicolor die normale epidermale Pigmentbildung durch einen Hemmstoff direkt beeinflusst wird. So sind auf der Haut von Farbigen die Pityriasis-versicolor-Läsionen deutlich heller, als die nicht befallene Haut, obgleich hier die ursprüngliche Hautfarbe nicht Folge einer Ultraviolettbestrahlung ist (1). Auch bei Läsionen, die nicht direkt der Sonnenbestrahlung ausgesetzt sind, wurde Depigmentierung beobachtet, die somit nicht Folge einer verminderten Ultraviolettbestrahlung sondern direkte Auswirkung der Mykose sein muß (1,7). Nach Abheilung der Pilzinfektion durch entsprechende Therapie waren Repigmentierungsversuche mit Ultraviolettbestrahlung erst nach einer Latenzzeit erfolgreich (13). Die epidermalen Melanozyten zeigen in der befallenen Haut Degenerationszeichen und zytotoxische Veränderungen an den Melanosomen, die nur spärlich pigmentbeladen sind (1,5,11). Durch Extrakte von Hautschuppen aus Pityriasis-versicolor-Läsionen ist eine in-vitro-Hemmung des für die Pigmentbildung notwendigen Enzyms, der Tyrosinase, beschrieben worden (13). Aus in-vitro-Kulturen von *Pityrosporum orbiculare* wurde ein Tyrosinaseinhibitor isoliert und als Azelainsäure identifiziert (17).

AETIOLOGIE

1846 entdeckte Eichstedt in Hautschuppen von Pityriasis versicolor einen Pilz, den Robin 1853 "*Mikrosporum furfur*" und Baillon 1889 "*Malassezia furfur*" benannte (1). Der Erreger ließ sich allerdings in den üblichen Kulturmedien nicht kultivieren und die experimentelle Auslösung der Erkrankung durch Inokulation mit Hautschuppen erwies sich als sehr schwierig. Gordon isolierte 1951 aus Schuppen von Pityriasis versicolor die Hefe "*Pityrosporum orbiculare*", mit der später experimentelle Infektionsversuche in Einzelfällen zu erfolgreicher Auslösung von Krankheiterscheinungen führten (1,3,9,10). *Malassezia furfur* beziehungsweise *Pityrosporum orbiculare* liegt in Effloreszenzen von Pityriasis versicolor immer in einer dimorphen Form mit gleichzeitigem Vorkommen von Sporen und Pilzhypen vor. In vitro ist die Hefe ausschließlich durch Sprosszellen, die den "Sporen" entsprechen, gekennzeichnet. Dimorphismus bei *Pityrosporum orbiculare* ist in vitro schwierig zu reproduzieren, gelang jedoch in speziellen Kulturmedien (6,16). Die experimentelle Auslösung von Pityriasis versicolor beim Menschen durch Inokulation mit *Pityrosporum orbiculare* und eine dimorphe Form von *Pityrosporum orbiculare* in speziellen Kulturmedien gelten als ausreichende Hinweise dafür, daß *Pityrosporum orbiculare* das ursächliche Agens für die Entstehung der Pityriasis versicolor ist. *Pityrosporum orbiculare* und *Malassezia furfur* sind nach diesen experimentellen Ergebnissen als identisch anzusprechen.

1874 ist von Malassez ein sporenförmiger Pilz in Schuppen der Kopfhaut beschrieben worden (1). 1913 wurde dieser Pilz von Castellani und Chalmers "*Pityrosporum ovale*" benannt (1). *Pityrosporum ovale* ist ein normaler Keim der Hautflora, hohe Keimzahlen kommen bei Schuppen der Kopfhaut, bei se-

borrhoischem Ekzem, bei bestimmten Formen der Follikulitis und bei bestimmten Formen der Akne vor, haben bei diesen Krankheitsbildern jedoch vermutlich keine pathogenetische Bedeutung. *Pityrosporum ovale* kommt in vivo nicht in der dimorphen Form wie *Pityrosporum orbiculare* bei Pityriasis versicolor vor, sondern nur monomorph als Spore beziehungsweise Sprosszelle. In vitro gelang es aber auch bei *Pityrosporum ovale* in speziellen Kulturmedien eine dimorphe Form mit Vorliegen von Sporen und Hyphen zu induzieren (16). Es ist daher letztlich noch nicht eindeutig geklärt, ob *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* zwei wohl zu unterscheidende Arten derselben Gattung oder nur zwei unterschiedliche Ausdrucksformen derselben Art sind.

FRAGESTELLUNG

Mit eigenen Untersuchungen sollte zuerst die Frage geklärt werden, ob tatsächlich in Hautschuppen von Pityriasis-versicolor-Läsionen Tyrosinasehemmstoffe nachzuweisen sind. Vergleichend dazu wurden Schuppen von nicht erkrankter Haut auf Tyrosinaseinhibitoren untersucht.

Nach dieser Pilotstudie wurde *Pityrosporum orbiculare* im Hinblick auf die Fähigkeit untersucht, bei Kultur in verschiedenen Lipidmedien Tyrosinaseinhibitoren zu bilden. Kontrollansätze mit den zur Kultivierung von *Pityrospora* benutzten sterilen Lipidsubstraten wurden zum Ausschluß einer unspezifischen Hemmung der DOPA-Tyrosinase-Reaktion durchgeführt. Vergleichende Untersuchungen an *Pityrosporum ovale* sollten dazu dienen, mögliche Unterschiede in der Stoffwechselleistung der beiden *Pityrosporum*-Arten zu erfassen. Die Feststellung identischer oder unterschiedlicher spezifischer Stoffwechselleistungen sollte indirekt zur Klärung der Frage beitragen, ob allein *Pityrosporum orbiculare* der ursächliche Faktor bei Pityriasis versicolor ist, oder ob *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* nur unterschiedliche Ausdrucksformen derselben Art sind. Vergleichend zu den isolierten aber nicht näher identifizierten Lipiden aus Kulturmedien und Haut wurden schließlich kommerziell verfügbare gereinigte Lipide im DOPA-Tyrosinase-Ansatz auf Hemmwirkung geprüft.

MATERIAL UND METHODEN

I. Lipidextraktion aus Hornlamellen von Pityriasis- versicolor-Läsionen und normaler Haut.

Bei Patienten mit klinisch und mykologisch (Nativpräparat-Untersuchung) gesicherter Pityriasis versicolor wurden von pilzbefallenen Hautarealen mit dem Skalpell Schuppen gewonnen. Ebenso wurde von korrespondierender, nicht befallener Haut der Patienten Material entnommen.

Für Vergleichsuntersuchungen wurde in gleicher Technik von gesunden Probanden Material gewonnen. Bei diesen Probanden war zum Zeitpunkt der Materialentnahme keine Pityriasis versicolor nachweisbar und anamnestisch hatte nie eine Pityriasis versicolor bestanden. Eine klinische und mykologische Kontrolluntersuchung der Probanden zwölf Wochen nach Materialentnahme ergab ebenfalls keinen Hinweis für eine Erkrankung an Pityriasis versicolor. Das so gewonnene Material wurde für eine wässrige Extraktion beziehungsweise für eine Ätherextraktion und Auftrennung der Extrakte in eine hydrophobe und hydrophile Fraktion verwendet.

Wässrige Extraktion

10 mg Schuppenmaterial wurden mit 10 ml phosphatgepufferter (0,05 M, pH 7,1) 0,8 % NaCl-Lösung eine Stunde unter sanftem Rühren mit dem Magnetrührer extrahiert. Danach wurden die Lösungen über einen Membranfilter (Sartorius, Typ SM) mit 0,45 µm Porenweite steril filtriert und das Filtrat wurde in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion auf Hemmwirkung geprüft.

Ätherextraktion und Auftrennung der Extrakte in eine hydrophobe und hydrophile Fraktion

10 mg Schuppenmaterial wurden mit 10 ml Äther eine Stunde mit dem Magnetrührer unter stetem sanftem Rühren extrahiert. Nach Abfiltrieren der Hautschuppen wurden 10 ml destilliertes Wasser zugesetzt, das mit 1N NaOH auf einen pH von 13 gebracht wurde. Nach erneuter Extraktion über fünf Minuten und Trennung der wässerigen und ätherischen Fraktion über einen Scheidetrichter wurde die Ätherfraktion im Rotationsverdampfer bei 30 Grad Celsius abgedampft und der Niederschlag in 10 ml phosphatgepufferter (0,05 M, pH 7,1) 0,8 % NaCl-Lösung gelöst. Die Lösung wurde über einen Membranfilter (Sartorius, Typ SM) mit 0,45 µm Porenweite steril filtriert. Die wässrige Fraktion wurde mit 1N NaCl auf pH 2 gebracht und dann mit 10 ml Äther fünf Minuten extrahiert. Anschließend wurden wässrige und ätherische Phase wieder über einen Scheidetrichter getrennt. Der Äther wurde im Rotationsverdampfer bei 30 Grad Celsius verdampft, der Niederschlag wie oben beschrieben in 10 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung gelöst und steril filtriert.

Durch die Extraktion und Auftrennung von Schuppenmaterial aus Pilzläsionen, normaler Haut von Pityriasis-versicolor-Patienten sowie von normaler Haut gesunder Probanden ergaben sich sechs verschiedene Fraktionen. Die Fraktion, die nach zweimaliger Ätherextraktion vorwiegend die hydrophilen Lipide enthielt, wurde Fraktion B1 benannt. Die Fraktion, die nach einmaliger Ätherextraktion hauptsächlich die hydrophoben Lipide enthielt, wurde Fraktion B2 benannt. Jeweils 1 ml der gewonnenen Extrakte wurde in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion auf Hemmwirkung geprüft.

II. Kultivierung von *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* in vitro

Pilze

Von *Pityrosporum ovale* wurden die Referenzstämme No. 4162, No. 1070 und No. 1878 vom CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland) für die Kulturen verwandt. Von *Pityrosporum orbiculare* wurden die Stämme M 14 und M 17 aus der Sammlung des mykologischen Labors der Dermatologischen Universitätsklinik München eingesetzt. Diese Stämme waren ursprünglich von Patienten, die an Pityriasis versicolor erkrankt waren, isoliert und seither in regelmässigen Abständen auf festen Kulturmedien subkultiviert worden. Die *Pityrosporum-orbiculare*-Stämme waren dadurch gekennzeichnet, daß bei ihnen in vitro der Hefe-Myzel-Dimorphismus induzierbar war.

Feste Nährböden

Für die Routinekultivierung und fortlaufende Züchtung der *Pityrosporum*-Hefen wurde ein Lipid Agar folgender Zusammensetzung verwandt: 2 % Olivenöl, 0,2 % Tween 80, 1 % Phyton, 0,1 % Hefe-Extrakt, 2 % Glucose, 1,5 % Agar. Es wurden 50 mg/l Chloramphenicol und 500 mg/l Cycloheximid zur Unterdrückung des Wachstums von Bakterien und Schimmelpilzen zugefügt. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren (zehn Minuten, 120 Grad Celsius) mit 1 N HCl auf 5,8 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium in Standardpetrischalen ausgegossen.

Kultivierung von Pityrosporum-Hefen auf festen Nährböden

Die Inkubation der Pilzkulturen erfolgte unter aeroben Bedingungen im Brutschrank drei Tage lang bei 36 Grad Celsius und weitere neunzehn Tage bei 28 Grad Celsius. Nach dieser Zeit wurde wieder auf ein neues Medium überimpft.

Flüssigmedien

Flüssigmedium A1: Als Standardnährmedium wurde das zur Routinekultivierung benutzte Festmedium unter Weglassen des Agars eingesetzt.

Flüssigmedium A2: Bei einem Teil der Ansätze wurde das Olivenöl im Standardnährmedium durch 2 % Ölsäure ersetzt.

Flüssigmedium B: Dieses Medium entsprach dem Lipid-Organisms-Maintenance-Medium nach Weary: 3,5 % Czapek Broth, 0,25 % Hefe-Extrakt und 7,5 % Tween 80.

Flüssigmedium C: Das Lipidmedium nach Weary wurde in einem weiteren Ansatz wie folgt verändert: 3,5 % Czapek Broth, 0,25 % Hefe-Extrakt, 1 % Tween 80 und 0,5 % Glucose. Diesem Medium wurde die mit Äther extrahierte Fraktion B1 aus den Hautschuppen von gesunden Probanden zugefügt. In der Fraktion B1 waren hydrophile Lipide enthalten, die nach den vorangegangenen Versuchen mit Hautschuppen von Pityriasis-versicolor-Patienten und gesunden Probanden eine Hemmung der DOPA-Tyrosinase-Reaktion zeigten. Die Konzentration des Inhibitors wurde so bemessen, daß zu Beginn der Schüttelkultur die Extinktionszunahme pro Minute in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion bei Einsatz von 0,1 ml nicht aufgetrennten Mediums nicht mehr als 0.04 - 0.06 E/min. betrug.

Sämtliche Flüssigmedien wurden vor dem Autoklavieren (zehn Minuten, 120 Grad Celsius) mit 1 N HCl auf einen pH von 5,8 eingestellt. An Antibiotika wurden 50 mg/l Chloramphenicol und 500 mg/l Cycloheximid zur Hemmung von Bakterien- und Schimmelpilzwachstum zugefügt.

Kultivierung von Pityrosporum-Hefen in Flüssigmedien

In 100 ml Erlenmeyer-Kolben wurden 20 ml Nährlösung mittels einer Platinöse mit auf festen Nährböden gewachsenen Pityrosporum-Hefen beimpft. Bei jedem Ansatz wurde zur Kontrolle ein nicht beimpftes Medium mitgeführt und den gleichen Kulturbedingungen unterworfen. Die Inkubation der Pityrosporum-Hefen erfolgte in Schüttelkultur mit 150 Umdrehungen/min. (Infors, Rundschüttelmaschine HT) bei 30 Grad Celsius 21 Tage lang.

Nach Inkubation wurden Kulturfiltrate durch Sterilfiltration über einen Membranfilter (Sartorius, Typ SM) mit 0,45 µm Porenweite hergestellt und in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion auf Hemmwirkung geprüft.

Auftrennung der Lipide

Von den mitgeführten Kontrollmedien und den bewachsenen Medien wurden nach Sterilfiltration je 2 ml mit 1N NaOH auf einen pH von 14 gebracht, mit 10 ml Äther fünf Minuten extrahiert und über einen Scheidetrichter getrennt. Mit 1N HCl wurde der pH-Wert des alkalisierten Flüssigmediums auf einen pH von 1 gesenkt, nochmals mit 10 ml Äther fünf Minuten extrahiert und erneut über einen Scheidetrichter getrennt. Die beiden Ätherfraktionen wurden jeweils in einen Rotationsverdampfer gegeben und der Äther bei 30 Grad Celsius abgedampft. Der Niederschlag wurde mit 2 ml phosphatgepufferter (0,05 M, pH 7,1) 0,8 % NaCl-Lösung gelöst. Die erste der beiden gewonnenen Fraktionen enthielt die hydrophoben Lipide, während in der zweiten die hydrophilen Lipide enthalten waren. Die Fraktion der gut wasserlöslichen Lipide, bei denen nach den vorangegangenen Versuchen mit Hautextrakten Hemmung der Tyrosinase zu vermuten war, wurde darauf in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion geprüft. Die Fraktion der hydrophoben Lipide und das extrahierte Flüssigmedium wurden verworfen, nachdem stichprobenartig vorgenommene Prüfungen auf Tyrosinasehemmung negativ ausgefallen waren.

III. Hemmung der Tyrosinase durch Reinsubstanzen

Kommerzielle verfügbare gereinigte Carbonsäuren und Dicarbonsäuren sowie die Lipidsubstrate zur Kultivierung von *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale*, Olivenöl, Ölsäure und Tween 80, wurden in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion auf eine mögliche Enzymhemmung geprüft. Da die Löslichkeit der Lipide unterschiedlich war, mußte der phosphatgepufferten (0,05 M, pH, 7,1) 0,8 % NaCl-Lösung 2 % Triton X-100 zugegeben werden. In dieser Lösung konnten die zur Messung vorgesehenen Lipide bei Zimmertemperatur gelöst werden. Die Konzentration der Lipide betrug 1 mg pro ml.

A. Lipidsubstrate

Olivenöl, Ölsäure, Tween 80.

B. Gesättigte Carbonsäuren

Buttersäure (C4), Oenanthsäure (C7), Pelargonsäure (C9), Laurinsäure (C12), Myristinsäure (C14), Palmitinsäure (C16). Die nach der Säure in Klammer angegebene Zahl gibt die Zahl der Kohlenstoffatome in der entsprechenden Säure und somit die Kettenlänge an.

C. Gesättigte Dicarbonsäuren

Bernsteinsäure (C4), Pimelinsäure (C7), Azelainsäure (C9), Tridecandisäure (C13), Hexadecandisäure (C16). Die Kettenlänge der Dicarbonsäuren ist entsprechend wie bei den Carbonsäuren angegeben.

DOPA-TYROSINASE-REAKTION

In den Mitochondrien und Mikrosomen der Melanozyten ist die für die Melaninbildung wichtige Tyrosinase enthalten. Das Enzym katalysiert die Oxydation von L-Tyrosin und L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und weiterer Zwischenprodukte, so daß daraus durch entsprechende Polymerisation Melanin entsteht, das dann von den Melanozyten an die Keratinozyten weitergegeben wird. Die DOPA-Tyrosinase-Reaktion wurde modifiziert nach Jung und Bohnert (13) durchgeführt, bei der die durch Tyrosinase vermittelte Umwandlung von DOPA in DOPACHINON photometrisch erfaßt wird. Für die in-vitro-Messung der Tyrosinase-Aktivität und ihrer Hemmung durch entsprechende Substanzen wurde eine aus Pilzen isolierte Tyrosinase (Sigma, Nr. T 7755) mit einer Aktivität von 4000 Einheiten pro mg verwandt. Eine Einheit ist als Extinktionszunahme von 0,001/min. bei einer Wellenlänge von 280 nm, einer Schichtdicke von 1 cm, pH 6,5, 25 Grad Celsius gegenüber L-Tyrosin als Substrat in einem Reaktionvolumen von 3 ml definiert. Die Tyrosinase wurde mit phosphatgepufferter (0,05M, pH 7,1) 0,8 % NaCl-Lösung gelöst. In 0,02 ml Lösung waren 20 Einheiten Tyrosinase enthalten. Als Substrat wurde L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) Serva (Nr. 19910) verwandt, das in phosphatgepufferter (0,05 M, pH 7,1) 0,8 % NaCl-Lösung mit 0,5 mg Substrat pro 0,2 ml Lösung gelöst war. Gemessen wurde in einem Reaktionsvolumen von 2 ml. Zur Leerwertkontrolle wurden zu den 0,2 ml an gelöstem DOPA 1,8 ml phosphatgepufferte (0,05 M, pH 7,1) 0,8 % NaCl-Lösung zugegeben. Die Reaktion wurde dann durch die Gabe von 20 Einheiten Tyrosinase eingeleitet. Gemessen wurde gegen einen optimalen Leerwert mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung. Nach Bestimmung des optimalen Leerwerts wurde die phosphatgepufferte Kochsalzlösung zum Teil oder vollständig gegen

entsprechende Lipidlösungen ausgetauscht. Für die Messung wurde ein Beckmann-Fotometer DB-G1 mit Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke verwandt. Es wurde die Extinktionsänderung pro Minute bei einer Wellenlänge von 475 nm und Zimmertemperatur über einen Zeitraum von fünf Minuten gemessen. Da die Tyrosinase geringe Aktivitätsschwankungen zeigte, wurde jede Messung zweimal durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

I. DOPA-Tyrosinase-Reaktion mit extrahierten Lipiden aus Hautschuppen von Pityriasis-versicolor-Läsionen und normaler Haut

Nach der Leerwertmessung, die unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt wurde, wurden 1 ml der Pufferlösung gegen 1 ml der in Puffer gelösten Hautextrakte ausgetauscht.

II. DOPA-Tyrosinase-Reaktion mit Flüssigmedien und Lipidfraktionen nach 21-tägiger Kultivierung von Pitysporum-Hefen

Nach Leerwertmessung wurden 0,1 ml Puffer gegen 0,1 ml Flüssigmedium oder 0,1 ml gepufferte Lipidfraktion ausgetauscht.

III. DOPA-Tyrosinase-Reaktion mit Lipidsubstraten, Carbonsäuren und Dicarbonsäuren

Von der phosphatgepufferten Kochsalzlösung wurden nach der Leerwertmessung 1,8 ml gegen die entsprechenden Lipidsubstrate und Carbonsäuren, die in Puffer mit 2 % Triton X-100 gelöst waren, ausgetauscht.

ERGEBNISSE

I. Lipidextraktion aus Hornlamellen von Pityriasis-versicolor-Läsionen und normaler Haut.

Wässrige Extraktion

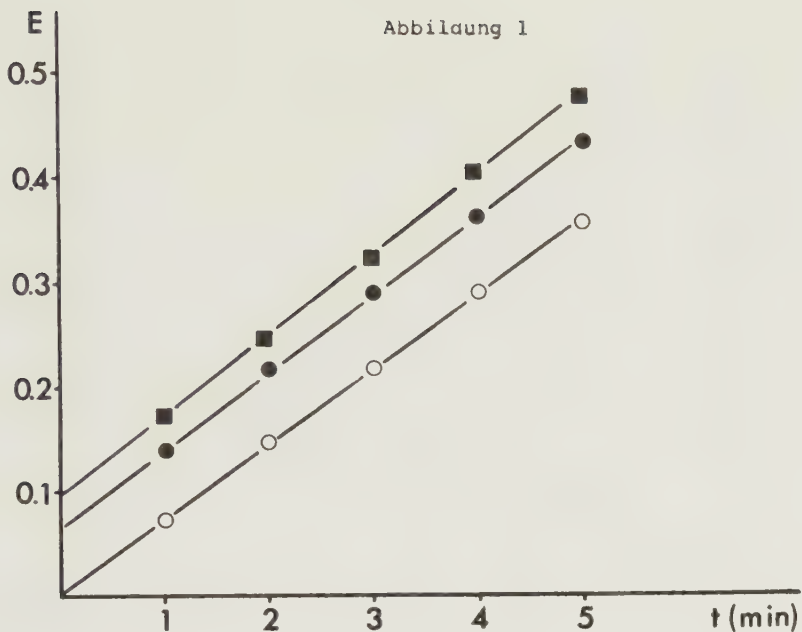
Die Fraktion A mit den in phosphatgepufferter Kochsalzlösung extrahierten Schuppen aus befallener und nicht befallener Haut von Pityriasis-versicolor-Patienten und von normaler Haut gesunder Probanden zeigte keine Hemmung der Tyrosinase (Abbildung 1).

Ätherextraktion und Auftrennung in eine hydrophobe und hydrophile Fraktion

Bei den mit Äther extrahierten und aufgetrennten Lipiden aus Hautschuppen war in der Fraktion der hydrophilen Lipide (Fraktion B1) sowohl bei gesunder, als auch bei erkrankter Haut eine Hemmung der Tyrosinase deutlich. Die Hemmung war bei dem Lipidextrakt aus Pityriasis-versicolor-Läsionen deutlich stärker als bei dem Extrakt aus nicht erkrankter Haut (Abbildung 2). In der Fraktion der hydrophoben Lipide (Fraktion B2) war nur bei normaler Haut eine geringe, wohl unspezifische Hemmung der Tyrosinase erkennbar. Sonst war in dieser Fraktion keine Tyrosinasehemmung nachweisbar (Abbildung 3).

Bei der Prüfung auf Tyrosinasehemmung ergab sich zwischen den Hautextrakten von gesunden Probanden und den Extrakten aus nicht erkrankter Haut von Pityriasis-versicolor-Patien-

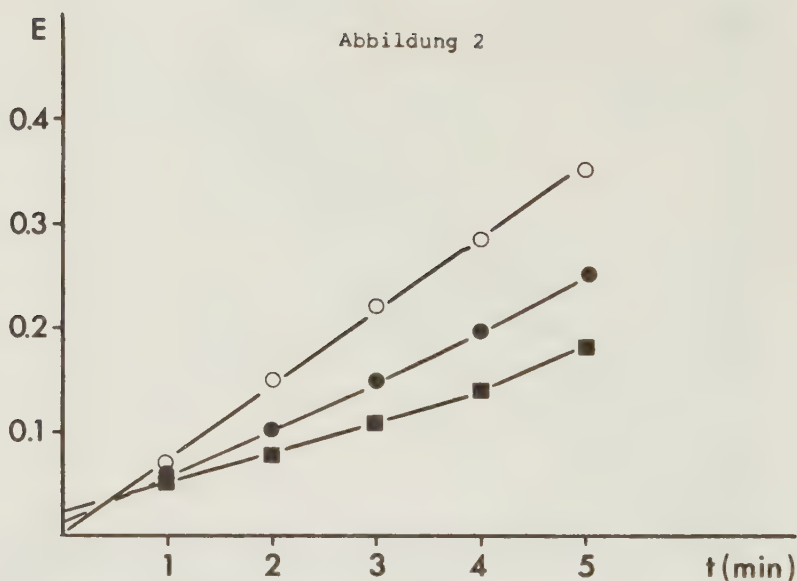
ten, bei der hier angewandten Methode, kein Unterschied. In den Abbildungen 1-4 ist daher unter dem Begriff "normale Haut" sowohl nicht befallene Haut von Pityriasis-versicolor-Patienten als auch Haut von gesunden Probanden zu verstehen.



[Leerwert: ○, normale Haut: ●, P.vers.-Läsion: ■]

DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit wässrig extrahierten Hautschuppen.

Die mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung extrahierten Hautschuppen der Fraktion A zeigen in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion keine Enzymhemmung.

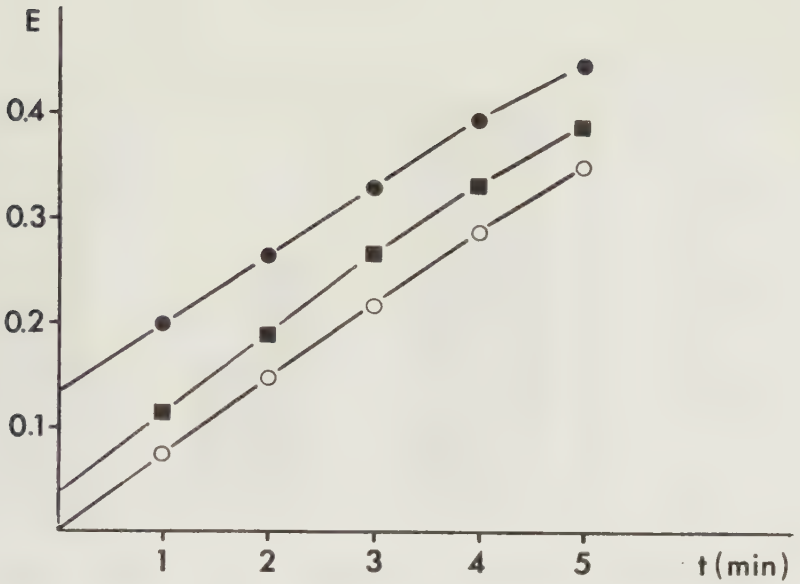


[Leerwert:○, normale Haut:●, P. vers.- Läsion:■]

DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit ätherextrahierten Lipiden aus Hautschuppen.

Die hydrophilen Lipide der Fraktion B1 lassen eine deutliche Tyrosinasehemmung erkennen. Die Hemmwirkung ist bei Pityriasis-versicolor-Läsionen stärker als bei normaler Haut. Normale, nicht erkrankte Haut zeigt jedoch ebenfalls eine deutliche Tyrosinasehemmung.

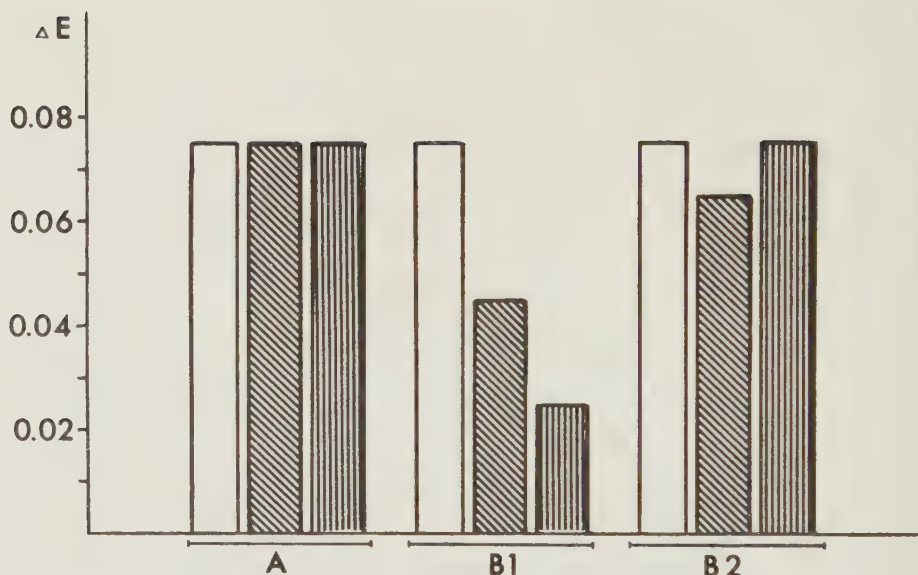
Abbildung 3



[Leerwert:○, normale Haut:●, P. vers.- Läsion:■]

DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit ätherextrahierten Lipiden aus Hautschuppen.

Die hydrophoben Lipide der Fraktion B2 zeigen keine Tyrosinasehemmung. Die Extinktionszunahme ist bei normaler Haut geringfügig erniedrigt, eine wesentliche Tyrosinasehemmung liegt hier jedoch ebenfalls nicht vor.



[Leerwert: □ normale Haut: ▨ P. vers.- Läsion: ▤]

Gegenüberstellung und Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abbildung 1 - Abbildung 3.

Die Extinktionsänderung in der zweiten Minute bei der DOPA-Tyrosinase-Reaktion in den Fraktionen A, B1 und B2 ist hier graphisch dargestellt. In Fraktion A beträgt die Extinktionsänderung bei Leerwert, normaler Haut und pilzbefallener Haut 0.075. Es ist keine Tyrosinasehemmung nachweisbar. In Fraktion B1 ist die Extinktionsänderung bei normaler Haut mit 0.045 und bei pilzbefallener Haut mit 0.025 im Vergleich zum Leerwert deutlich erniedrigt. Bei pilzbefallener Haut liegt eine starke und bei normaler Haut eine mittlere Tyrosinasehemmung vor. In der Fraktion B2 ist die Extinktionsänderung bei normaler Haut im Vergleich zum Leerwert mit 0.065 leicht erniedrigt, bei pilzbefallener Haut mit 0.075 gleich dem Leerwert. Eine wesentliche Tyrosinasehem-

mung bei normaler Haut liegt nicht vor. Bei pilzbefallener Haut ist keine Tyrosinasehemmung nachweisbar.

II. Kultivierung von *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* in vitro.

Prüfung der Nativmedien auf Tyrosinasehemmung

Flüssigmedium A1

Das Flüssigmedium mit Olivenölsatz zeigte keine Hemmung der Tyrosinase. Das nicht beimpfte Kontrollmedium und die mit *Pityrosporum orbiculare* oder *Pityrosporum ovale* bewachsenen Medien zeigten im Vergleich zum Leerwert in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion keinen Unterschied (Abbildung 5).

Flüssigmedium A2

Nativ eingesetzt zeigte das Flüssigmedium mit Ölsäurezusatz ebenfalls keine Hemmung der Tyrosinase. Das mitgeführte Kontrollmedium und die mit *Pityrosporum*-Hefen bewachsenen Medien zeigten die gleiche Extinktionszunahme in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion wie der Leerwert (Abbildung 7).

Flüssigmedium B

Nativ eingesetzt zeigte auch das Lipid-Organismens-Maintenance-Medium nach Weary keine Enzymhemmung. In der DOPA-Tyrosinase-Reaktion zeigten Kontrollmedium und bewachsene Medien ein mit dem Leerwert identisches Verhalten (Abbildung 9).

Flüssigmedium C

In dem veränderten Flüssigmedium nach Weary, dem vor Inkubation mit *Pityrospora* Hautextrakt mit Tyrosinaseinhibitorwirkung beigegeben worden war, war nach einundzwanzigtägiger Kultivierung nativ keine Tyrosinasehemmung feststell-

bar. Die vor Beginn der Kultivierung im nativen Medium nachweisbare Enzymhemmung, die durch die Zugabe von Fraktion B1 aus Hautschuppen erzielt worden war, konnte jetzt nicht mehr nachgewiesen werden. Nicht beimpftes Kontrollmedium und bewachsene Medien verhielten sich identisch dem Leerwert in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Abbildung 11 und Abbildung 12).

Prüfung der hydrophilen Fraktion der Kulturmedien auf Tyrosinasehemmung

Nach Ätherextraktion und Auftrennung in eine hydrophile und eine hydrophobe Fraktion, wurde die Fraktion mit den hydrophilen Lipiden auf ihre Tyrosinasehemmung geprüft. Die stichprobenartig durchgeführte Prüfung auf Tyrosinasehemmung in den Flüssigmedien nach Ätherextraktion und in der Fraktion der hydrophoben Lipide war negativ ausgefallen.

Flüssigmedien A1

In dem Flüssigmedium mit Olivenöl zeigte die hydrophile Fraktion des mitgeführten, nicht beimpften Kontrollmediums nach einundzwanzig Tagen eine deutliche Hemmung der Tyrosinase. Eine wesentlich stärkere Hemmung der Tyrosinase war allerdings bei der hydrophilen Fraktion der mit *Pityrospora* bewachsenen Medien festzustellen. Sowohl *Pityrosporum orbiculare* M 14, M 17 als auch *Pityrosporum ovale* CBS 4162, CBS 1878 und CBS 1070 ließen in diesen Fraktionen eine starke Enzymhemmung erkennen. Unterschiede in der Stärke der Tyrosinasehemmung zwischen den einzelnen Stämmen von *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* konnten nicht festgestellt werden (Abbildung 6).

Flüssigmedium A2

In der hydrophilen Fraktion des Flüssigmediums mit Ölsäure war die Enzymhemmung im mitgeführten, nicht beimpften Kon-

trollmedium gleich stark, wie in den mit *Pityrosporum orbiculare* M14, M17, *Pityrosporum ovale* CBS 4162, CBS 1878 und CBS 1070 beimpften Medien. Die verschiedenen Stämme der *Pityrosporum*-Hefen unterschieden sich auch hier in der Stärke ihrer Tyrosinasehemmung nicht (Abbildung 8).

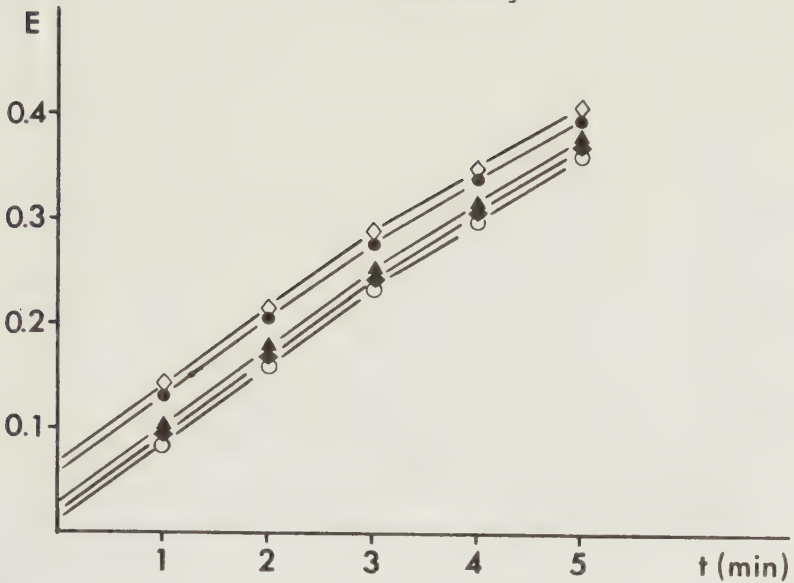
Flüssigmedium B

In den hydrophilen Fraktionen des Lipid-Organismens-Maintenance-Medium nach Weary war keine wesentliche Tyrosinasehemmung meßbar. Eine sehr geringe Hemmung kann nach dem Kurvenverlauf bei dem nicht beimpften Kontrollmedium und den Medien von *Pityrosporum orbiculare* M 14, M 17, *Pityrosporum ovale* CBS 4162, CBS 1878, CBS 1070 diskutiert werden. Zwischen nicht beimpftem Kontrollmedium und den mit *Pityrospora* bewachsenen Medien ergab sich kein Unterschied. Auch konnten keine Hinweise für eine mögliche Unterscheidung zwischen den einzelnen *Pityrosporum*-Hefen gefunden werden (Abbildung 10).

Flüssigmedium C

Nach Auftrennung des Mediums war in der hydrophilen Fraktion der vor Kultivierung zugefügte Tyrosinasehemmstoff wieder nachweisbar. Zwischen dem nicht beimpften Kontrollmedium und den mit *Pityrosporum orbiculare* M 14, M 17 und *Pityrosporum ovale* CBS 4162, CBS 1878, CBS 1070 beimpften Medien gab es keine Unterschiede in der Stärke der Tyrosinasehemmung. Die jetzt gemessene Hemmung entsprach der, die zu Beginn der Schüttelkulturen im nicht aufgetrennten Medium nach Zugabe von Fraktion B1 aus Hautschuppen gesunder Probanden, gemessen worden war (Abbildung 13).

Abbildung 5

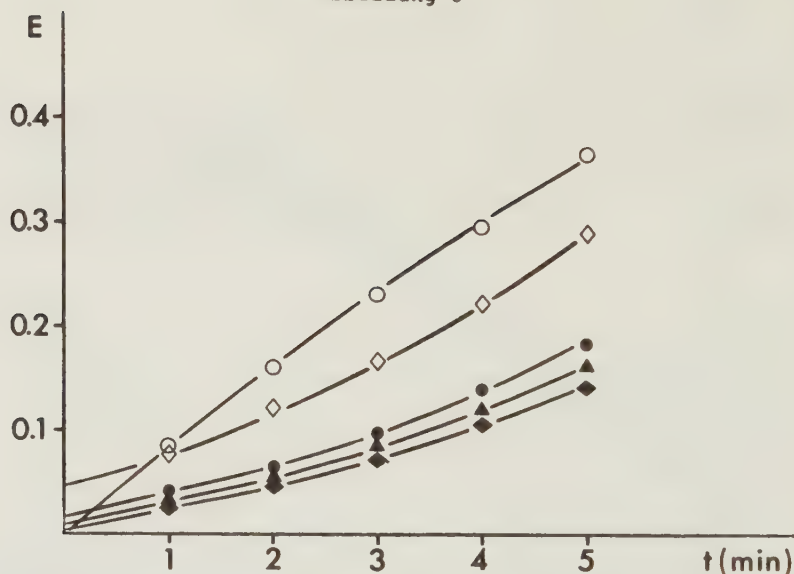


[Leerwert: ○ Mediumkontrolle: ◇
 P. orbiculare M 14, M 17: ●
 P. ovale CBS 1878, 4162: ▲; CBS 1070: ◆]

DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit nativen Kulturfiltraten des Flüssigmediums Al.

Im Flüssigmedium mit Olivenöl war nach einundzwanzigtägiger Kultivierung von Pityrosporum-Hefen keine Tyrosinasehemmung nachweisbar. Leerwert, Mediumkontrolle und die mit Pityrosporum-Hefen bewachsenen Medien zeigen identisches Verhalten in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion.

Abbildung 6

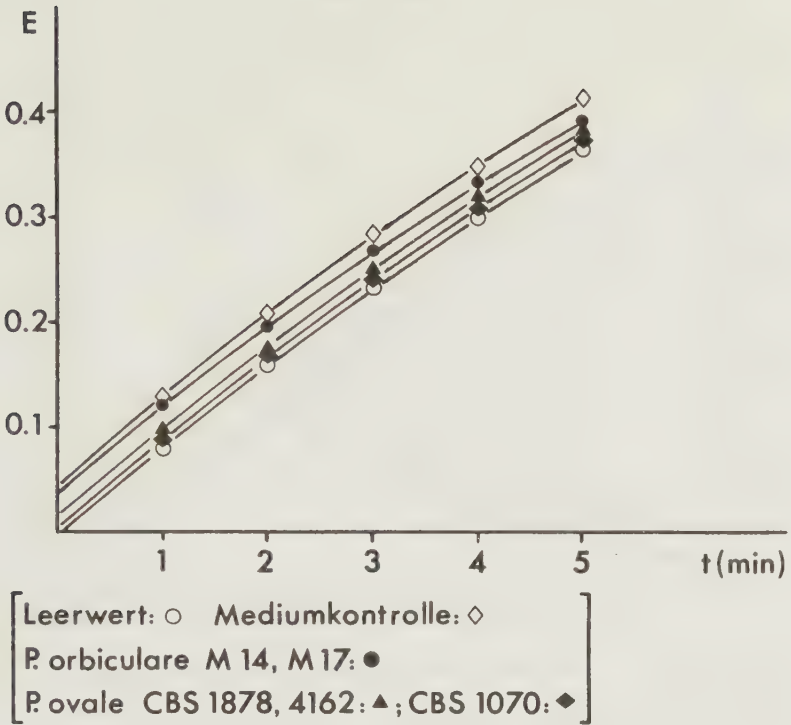


[Leerwert: ○ Mediumkontrolle: ◇
 P. ovale CBS 4162: ▲, 1070, 1878: ◆
 P. orbiculare M 14: ●, M 17: ▲]

DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit den ätherextrahierten hydrophilen Fraktionen des Flüssigmediums A1.

Im Flüssigmedium mit Olivenöl zeigt das mitgeführte, nicht beimpfte Kontrollmedium nach einundzwanzig Tagen eine deutliche Hemmung der Tyrosinase. Die mit *Pityrosporum*-Hefen bewachsene Medien lassen jedoch eine wesentlich stärkere Enzymhemmung erkennen. Ein Unterschied in der Stärke der Tyrosinasehemmung zwischen den einzelnen *Pityrosporum*-Hefen konnte nicht gesehen werden.

Abbildung 7



DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit nativen Kulturfiltraten des Flüssigmediums A2.

Das Lipidmedium mit Ölsäure zeigte nach einundzwanzigtägiger Kultivierung von *Pityrosporum*-Hefen keine Tyrosinasehemmung. Die Extinktionszunahme war bei Leerwert, Kontrollmedium und den mit *Pityrosporum*-Hefen bewachsenen Medien identisch.

Abbildung 8

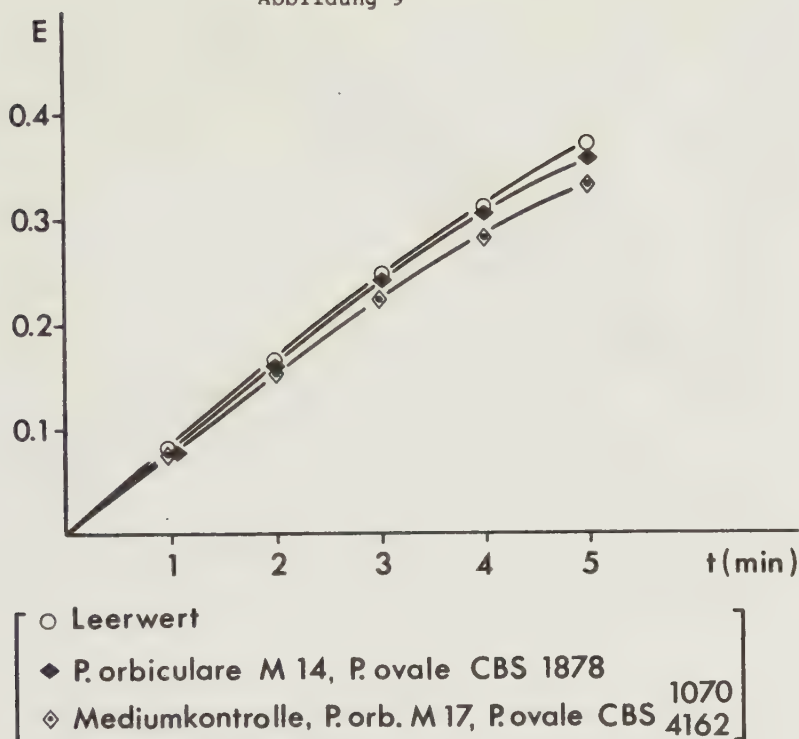


[Leerwert: ○ Mediumkontrolle: ◇
 P. orbiculare M14: ● M17: ■
 P. ovale CBS 1878, 4162: ▲ CBS 1070: ◆]

DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit ätherextrahierten hydrophilen Fraktionen des Flüssigmediums A2.

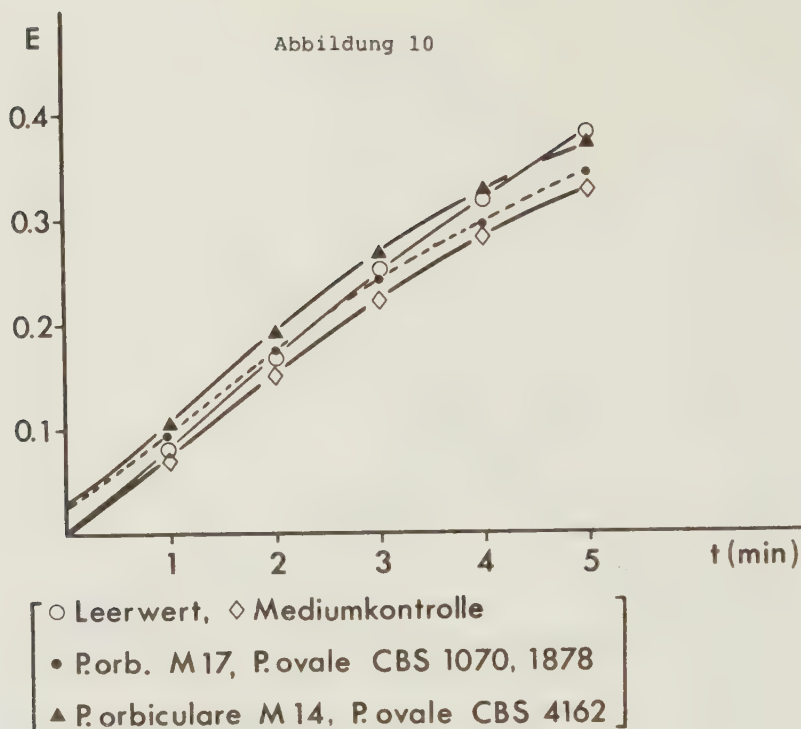
Im Flüssigmedium mit Ölsäure war nach Auftrennung eine Tyrosinasehemmung feststellbar. Die Enzymhemmung war im mitgeführten, nicht beimpften Kontrollmedium gleich stark wie in den mit *Pityrosporum*-Hefen bewachsenen Medien.

Abbildung 9



DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit nativen Kulturfiltraten des Flüssigmediums B.

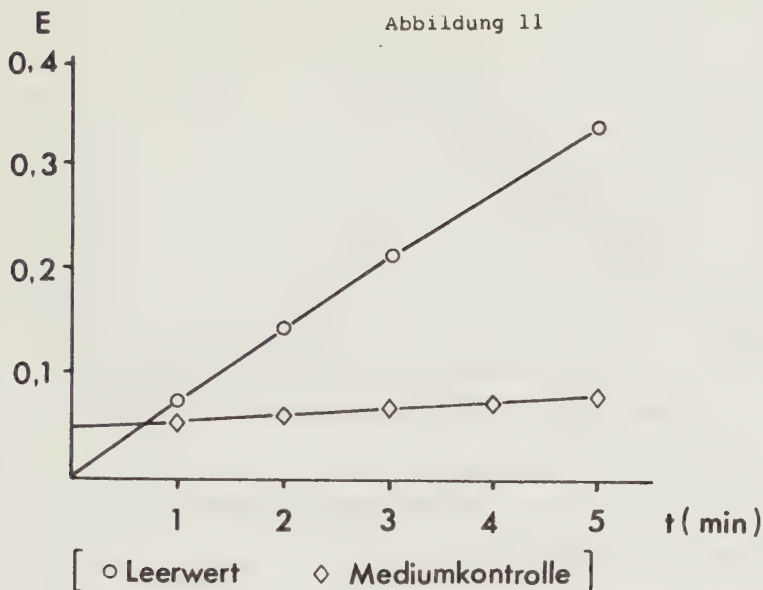
Im Lipid-Organismens-Maintenance-Medium nach Weary war nach einundzwanzigtägiger Kultivierung von Pityrosporum-Hefen keine Tyrosinasehemmung nachweisbar. Leerwert, Mediumkontrolle und mit Pityrosporum-Hefen bewachsene Medien zeigten identisches Verhalten in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion.



DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit ätherextrahierten hydrophilen Fraktionen des Flüssigmediums B.

Eine wesentliche Tyrosinasehemmung konnte bei der Mediumkontrolle und den bewachsenen Medien nicht festgestellt werden. Unter Berücksichtigung eines geringgradig flacheren Kurvenverlaufes bei Mediumkontrolle und bewachsenen Medien könnte eine minimale Tyrosinasehemmung diskutiert werden. Unterschiede zwischen der Mediumkontrolle und den einzelnen Pityrosporum-Hefen in der Enzymhemmung ergaben sich nicht.

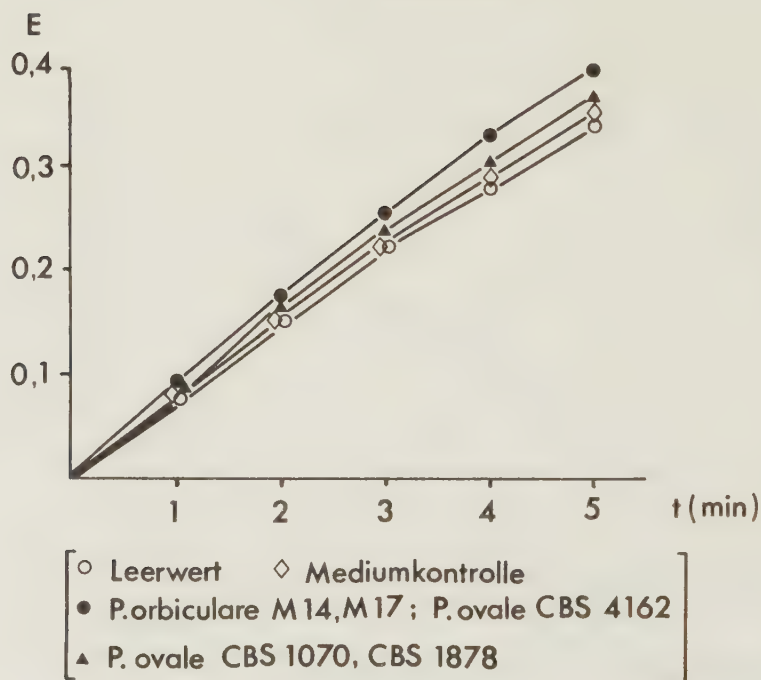
Abbildung 11



DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit nativ eingesetztem Flüssigmedium C vor Kultivierung.

Im nicht aufgetrennten nativen Medium war vor Kultivierung der zugegebene Tyrosinasehemmstoff aus der Fraktion B1, von Hautschuppen gesunder Probanden, nachweisbar. Die Extinktionszunahme betrug nicht mehr als 0.04 - 0.08 E/min.

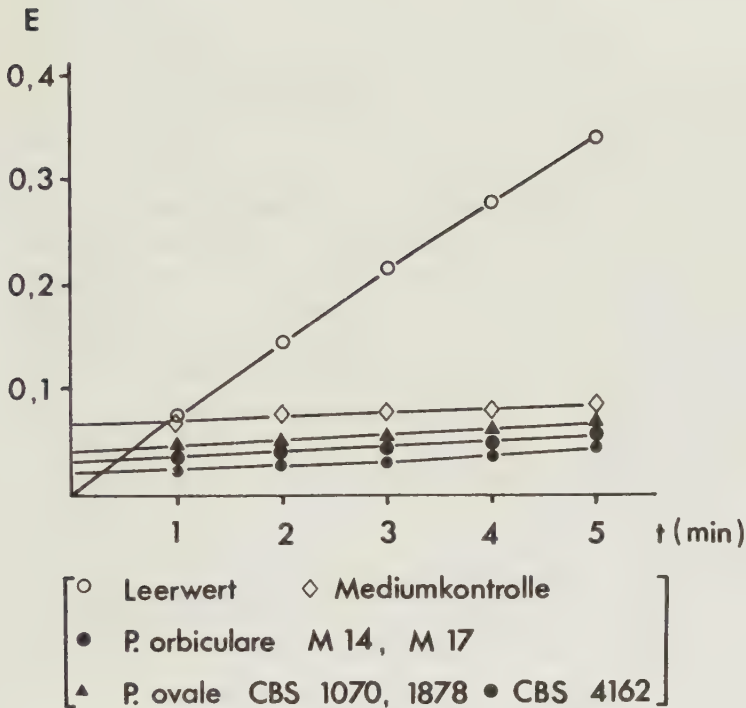
Abbildung 12



DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit nativen Kulturfiltraten des Flüssigmediums C.

Im Flüssigmedium C war nach einundzwanzigtägiger Kultivierung von Pityrosporum-Hefen keine Tyrosinasehemmung nachweisbar. Leerwert, Mediumkontrolle und mit Pityrosporum-Hefen bewachsene Medien zeigten identisches Verhalten in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion.

Abbildung 13



DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit ätherextrahierten hydrophilen Fraktionen des Flüssigmediums C.

In der hydrophilen Fraktion des Flüssigmediums C war der vor Kultivierung zugegebene Tyrosinasehemmstoff der Fraktion B1 von Hautschuppen gesunder Probanden wieder nachweisbar. Zwischen dem mitgeführten, nicht beimpften Kontrollmedium und den mit *Pityrosporum*-Hefen bewachsenen Medien gab es keinen Unterschied in der Stärke der Tyrosinasehemmung. Die jetzt gemessene Enzymhemmung entsprach der, die zu Beginn der Schüttelkulturen im nicht aufgetrennten Medium gemessen worden war.

III. Hemmung der Tyrosinase durch Reinsubstanzen

Um eine unspezifische Hemmung der Detergenzlösung (phosphatgepufferte 0,05 M, pH 7,5, 0,8 % NaCl-Lösung mit 2 % Triton X-100-Zusatz) auszuschließen, wurde diese vergleichend zum üblichen Leerwert auf eine Tyrosinasehemmung geprüft. In der DOPA-Tyrosinase-Reaktion zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen dem üblichen Leerwert und dem Leerwert mit 2 % Triton X-100-Zusatz. Darauf wurden die in Detergenzlösung gelösten Lipide in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion geprüft.

A. Lipidsubstrate

Die zur Kultivierung von *Pityrosporum ovale* und *Pityrosporum orbiculare* verwandten Lipidsubstrate Tween 80, Olivenöl und Ölsäure zeigten keine wesentliche Hemmung der Tyrosinaseaktivität.

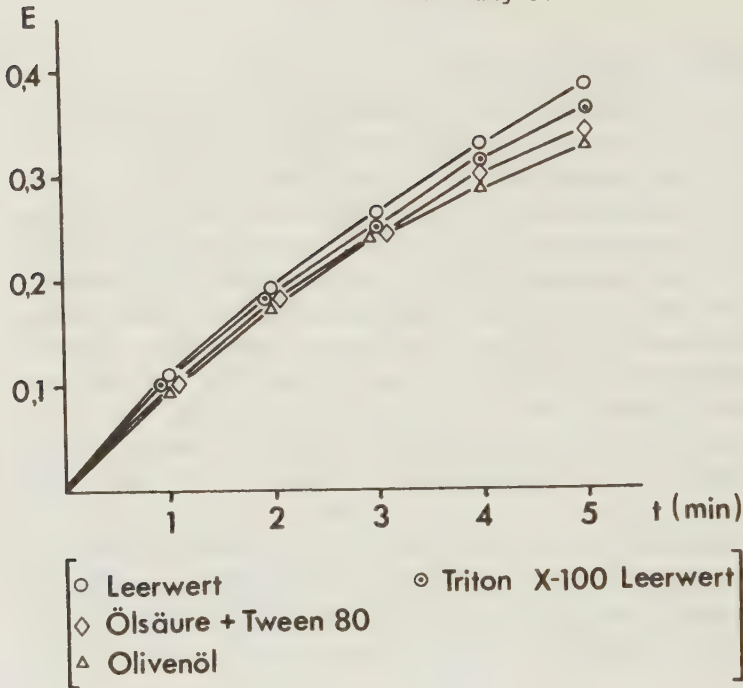
B. Gesättigte Carbonsäuren

In der DOPA-Tyrosinase-Reaktion ließ sich bei Buttersäure (C4) über Oenanthsäure (C7), zu Perlargonsäure (C9) eine deutliche und zunehmende Enzymhemmung messen. Bei weiter zunehmender Kettenlänge der Carbonsäuren kam es wieder zu einer Abnahme der Tyrosinasehemmung. Laurinsäure (C12) zeigte nur noch eine unwesentliche Hemmung. Bei Myristinsäure (C14) und Palmitinsäure (C16) war nahezu keine Hemmung der Tyrosinase mehr messbar.

C. Gesättigte Dicarbonsäuren

Bei den Dicarbonsäuren war ein ähnliches Verhalten wie bei den Carbonsäuren in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion festzustellen. Mit zunehmender Kettenlänge fand sich zunächst eine stärkere Enzymhemmung. Bei weiter zunehmender Kettenlänge kam es dann jedoch wieder zu einer Abnahme der Tyrosinasehemmung. Bernsteinsäure (C4) und Pimelinsäure (C7) zeigten eine ähnlich starke Tyrosinasehemmung wie die Carbonsäuren entsprechender Kettenlänge. Bei Azelainsäure (C9) war eine wesentlich stärkere Enzymhemmung festzustellen wie bei der Carbonsäure entsprechender Kettenlänge (Pelargonsäure). Bei Tridecandisäure (C13) konnte noch eine gleich starke Tyrosinasehemmung wie bei Azelainsäure festgestellt werden. Hexadecandisäure (C16) zeigte eine abnehmende, jedoch noch deutliche Hemmung der Tyrosinase. Im Vergleich zu den Carbonsäuren ist festzustellen, daß die Dicarbonsäuren mit Ausnahme der kurzkettigen Säuren eine deutlich stärkere Hemmung der Tyrosinase zeigen.

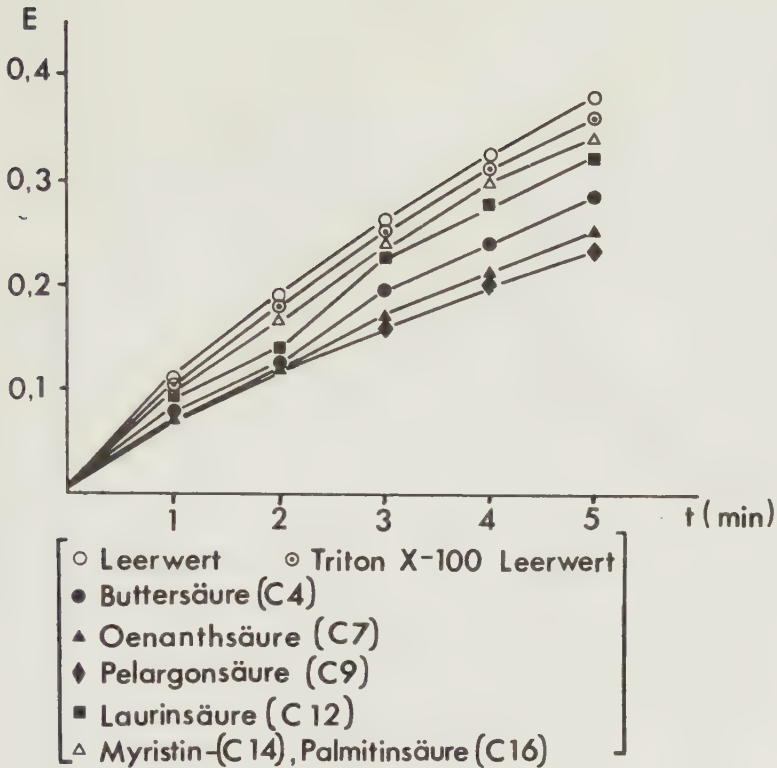
Abbildung 14



DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit den zur Kultivierung von *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* benutzten Lipidsubstraten.

Tween 80, Olivenöl und Ölsäure zeigten keine wesentliche Tyrosinasehemmung. Bei der Leerwertmessung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung unter Zusatz von 2 % Triton X-100 war kein Unterschied zu der üblichen Leerwertmessung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung ohne Zusatz festzustellen.

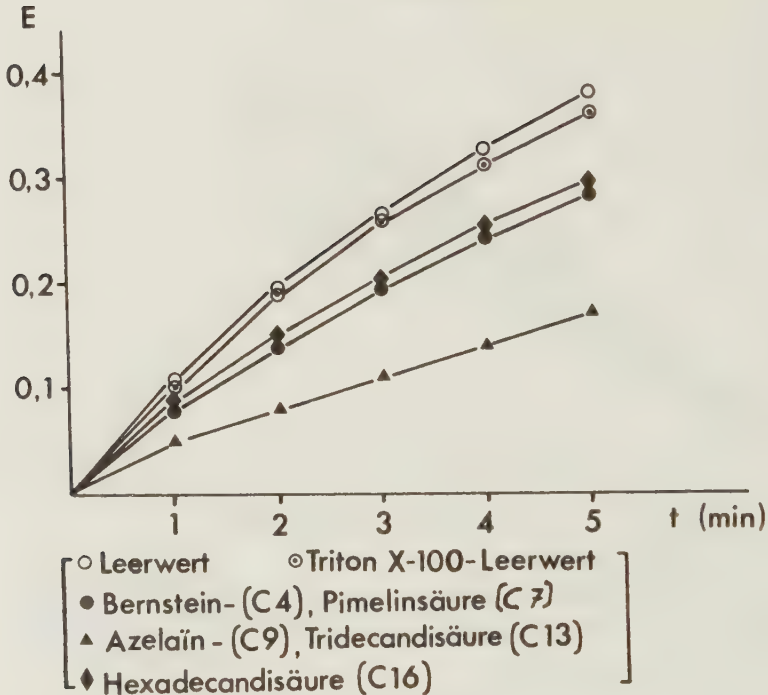
Abbildung 15



DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit Carbonsäuren.

Von Buttersäure (C4) über Oenanthsäure (C7) zu Pelargonsäure (C9) ist eine zunehmende Tyrosinasehemmung festzustellen. Bei Laurinsäure (C12) ist wieder eine deutliche Abnahme der Enzymhemmung zu erkennen. Myristinsäure (C14) und Palmitinsäure (C16) zeigen nahezu keine Hemmung der Tyrosinase.

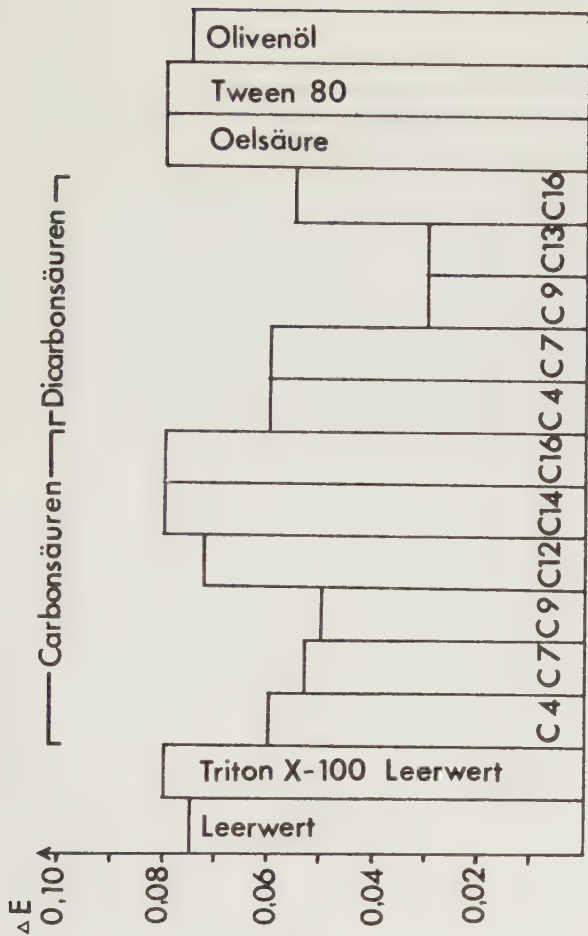
Abbildung 16



DOPA-Tyrosinase-Reaktion (Extinktionsänderung über fünf Minuten) im Ansatz mit Dicarbonsäuren.

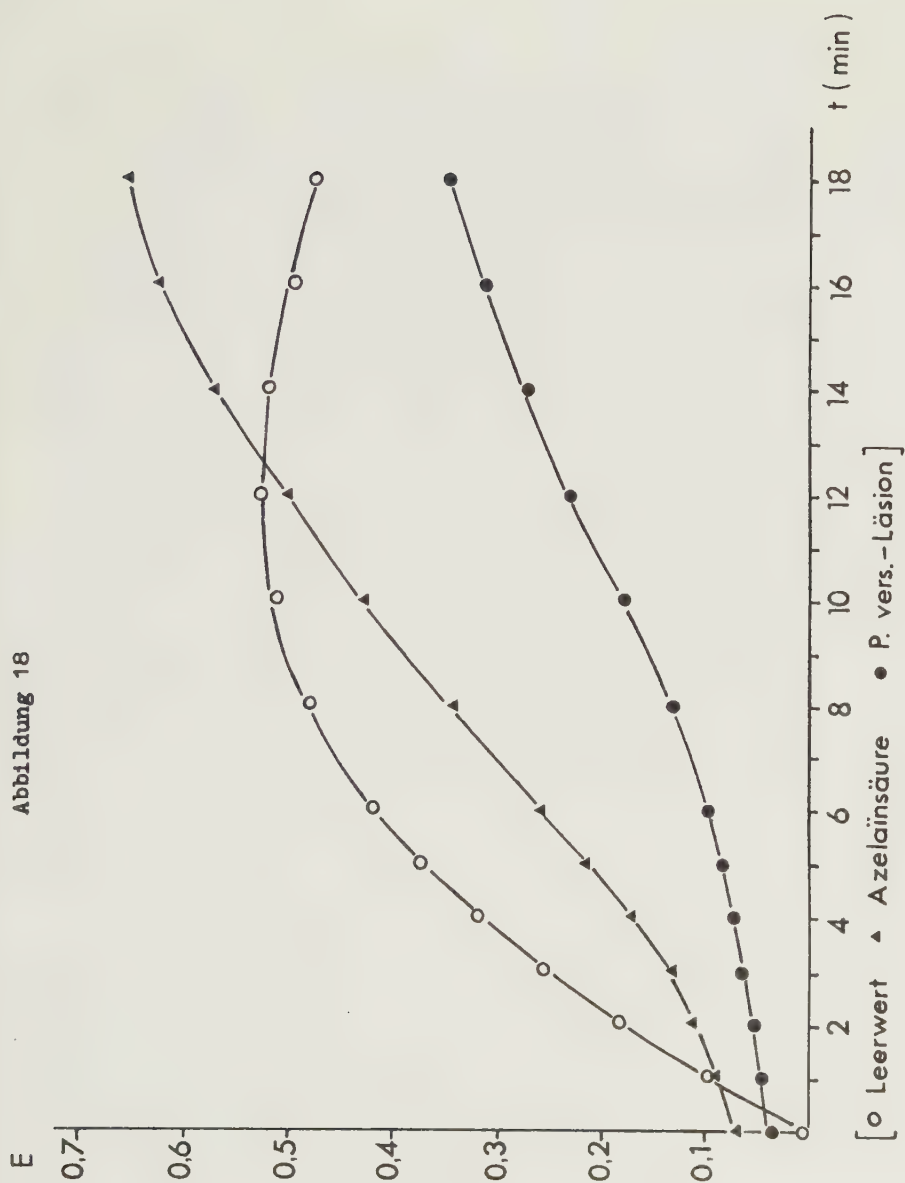
Bernsteinsäure (C4) und Pimelinsäure (C7) bewirken eine ähnlich starke Hemmung wie die Carbonsäuren entsprechender Kettenlänge (Buttersäure, Oenanthsäure). Azelaïnsäure (C9) und Tridecandisäure (C13) bewirken eine ungleich stärkere Tyrosinasehemmung verglichen mit den entsprechenden Carbonsäuren (Pelargonsäure, Laurinsäure, Myristinsäure). Hexadecandisäure (C16) zeigt wieder eine geringere, aber noch deutliche Tyrosinasehemmung und unterscheidet sich hier von der entsprechenden Carbonsäure, der Palmitinsäure, die keine Hemmwirkung mehr zeigt.

— Carbonsäuren — — — — — Dicarbonsäuren —

[illegible]

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Prüfung von Olivenöl, Tween 80, Ölsäure, Carbonsäuren und Dicarbonsäuren auf Tyrosinasehemmung nochmals zusammengefaßt. Es ist die Extinktionsänderung in der zweiten Minute in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion bei den verschiedenen Lipiden festgehalten. Das in der Literatur (7, 15, 24) beschriebene Kulturverhalten von *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* ist diesen Ergebnissen aus der DOPA-Tyrosinase-Reaktion gegenübergestellt. Es zeigt sich hier, daß *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* für ihr Wachstum besonders langkettige Fettsäuren benötigen, während die Enzymhemmung durch kurzkettige Fettsäuren erfolgt.

Abbildung 18



In Abbildung 18 ist das Ergebnis eines Ansatzes dargestellt, bei dem die Tyrosinasehemmung durch Azelainsäure der Enzymhemmung durch die ätherextrahierte, hydrophile Fraktion aus Pityriasis-versicolor-Läsionen gegenüber gestellt wird. Gemessen wurde die Extinktionsänderung über achtzehn Minuten. In der wie üblich durchgeführten DOPA-Tyrosinase-Reaktion wurden 0,05 ml einer mit Azelainsäure gesättigten, phosphatgepufferten (0,05 M, pH 7,1) 0,8 % NaCl-Lösung eingesetzt. Von den aus Pityriasis-versicolor-Läsionen ätherextrahierten, hydrophilen Lipiden, die ebenfalls in phosphatgepuffelter Kochsalzlösung gelöst waren, wurden in der Reaktion 1 ml verwandt. Es wurde bei diesem Versuch auf eine exakte Mengenbestimmung der eingesetzten Substanzen verzichtet; geprüft werden sollte, ob beide Substanzen einen gleichartigen Kurvenverlauf in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion zeigen. Wie die Abbildung erkennen läßt, zeigen beide Substanzen eine Tyrosinasehemmung mit einem gestreckten, flachen, s-förmigen Kurvenverlauf. Beim Leewert kam es in der gemessenen Zeit von Ausfällen von schwarzen Pigmentflecken zu einer Extinktionsabnahme, während in der Reaktion mit Azelainsäure oder Hautextrakt nach achtzehn Minuten noch keine wesentliche Pigmentausfällung festzustellen war.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollten Ursachen für die auffällige Hypopigmentation infizierter Hautbezirke bei Pityriasis versicolor, die vor allem nach Sonnenbestrahlung deutlich wird, untersucht werden. Nach Untersuchungen von Nazaro Porro (17) kann vermutet werden, daß Stoffwechselprodukte oder Toxine des verursachenden Pilzes direkte Hemmstoffe der Melaninsynthese darstellen und die Pigmentierung pilzbefallener Areale hemmen. Bei den eigenen Untersuchungen wurde daher in Kulturfiltraten des Hefepilzes *Pityrosporum orbiculare*, der bei Pityriasis versicolor als ursächliches Agens angesehen wird und aus entsprechenden Effloreszenzen isoliert werden kann, nach Hemmstoffen der Pigmentbildung gesucht. *Pityrosporum ovale* wurde vergleichend untersucht, um ein mögliches Unterscheidungsmerkmal in der Stoffwechselleistung der beiden Hefen zu finden. Bisher ist bekannt, daß aus Hautschuppen von Pityriasis-versicolor-Läsionen ein Tyrosinasehemmstoff extrahiert werden kann (13). Bekannt ist weiter, daß es in den Hautläsionen bei Pityriasis versicolor zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Hautoberflächenlipide kommt. Die Triglyceride sind bei Pityriasis versicolor deutlich erniedrigt, während die freien Fettsäuren, insbesondere die ungesättigten Fettsäuren, erhöht sind. Cholestrin und Cholestrinester sind in den Hautläsionen von Pityriasis versicolor ebenfalls gering erhöht (4,14). Für *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* konnte in vitro eine deutliche lipolytische Aktivität nachgewiesen werden (14,23). Beide Hefen spalten Triglyceride in Glycerin und freie Fettsäuren auf. Zum Wachstum benötigen beide Hefen Fettsäuren mit einer Kettenlänge von zwölf bis etwa vierundzwanzig Kohlenstoffatomen (15,22). Ob *Pityro-*

sporum orbiculare und Pityrosporum ovale zum Wachstum eher ungesättigte Fettsäuren oder gesättigte Fettsäuren benötigen, ist nach den bisherigen Untersuchungen nicht vollständig geklärt. Nach Untersuchungen von Nazzaro-Porro konnte aus Kulturen von Pityrosporum orbiculare Azelainsäure isoliert werden, die eine deutliche Tyrosinasehemmung zeigte. Das Kulturmedium enthielt Ölsäure als Lipidsubstrat und die Bildung von Dicarbonsäuren wurde als oxydative Aufspaltung der Ölsäure durch das Enzymsystem von Pityrosporum orbiculare interpretiert (17).

Nach den eigenen Untersuchungen ist eine Tyrosinasehemmung nicht nur mit Extrakten aus Pityriasis-versicolor-Läsionen sondern auch mit Extrakten aus normaler, nicht erkrankter Haut möglich. In der mit Pityrosporum-Hefen befallenen Haut scheint die Konzentration des Hemmstoffes jedoch erhöht zu sein. Ein wesentlicher Unterschied in der Tyrosinasehemmung bei Hautextrakten von gesunden Probanden und den Extrakten aus nicht erkrankter Haut bei Pityriasis-versicolor-Patienten konnte nicht festgestellt werden. Der Hemmstoff ist nicht spontan wasserlöslich. Erst nach Ätherextraktion ist eine Hemmwirkung nachzuweisen, so daß es sich bei dem Inhibitor wahrscheinlich um ein Lipid handeln muß. Bei der Auftrennung des Ätherextraktes in einen hydrophilen (Fraktion B1) und hydrophoben (Fraktion B2) Anteil konnte die Tyrosinasehemmung in der hydrophilen Fraktion nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, daß der Hemmstoff mit Anteilen der hydrophoben Fraktion primär eine komplexe Bindung eingeht, und daß deswegen seine Wirkung erst nach Abtrennung dieser Anteile in vitro nachweisbar ist. Da eine Wasserlöslichkeit des Inhibitors besteht, muß neben der apolaren Gruppe eine polare Gruppe im Molekül diese Löslichkeit bewirken. Bei Fettsäuren mit einer geringen Kohlenstoffato-

menzahl ist dies der Fall. Bei der Prüfung von Reinsubstanzen auf Tyrosinasehemmung konnte gerade bei den kurzkettigen Carbonsäuren und speziell bei den kurzkettigen Dicarbonsäuren eine Tyrosinasehemmung nachgewiesen werden. Der Analogieschluß liegt nahe. Ob es sich bei den aus Hautschuppen extrahierten Tyrosinasehemmstoffen tatsächlich um kurzkettige Carbonsäuren und Dicarbonsäuren handelt, müßte noch durch eine Dünnschichtchromatographie bewiesen werden.

In den Kulturmedien von *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* konnte primär keine Tyrosinasehemmung nachgewiesen werden. Auch bei den nicht beimpften Kontrollmedien war keine Tyrosinasehemmung festzustellen. Nach Abtrennung hydrophober Bestandteile war in der hydrophilen Fraktion der Medien mit Olivenöl (Flüssigmedium A1) und Ölsäure (Flüssigmedium A2) eine deutliche Enzymhemmung nachzuweisen. In dem Lipidmedium mit Tween 80 (Flüssigmedium B) als Lipidsubstrat war auch nach Auftrennung in der hydrophilen Fraktion nur eine minimale Tyrosinasehemmung festzustellen, wobei sich die mit *Pityrosporum*-Hefen bewachsenen Medien nicht vom mitgeführten Kontrollmedium unterschieden. Zum Nachweis eines Tyrosinasehemmstoffes in den entsprechenden Medien konnte die Aufarbeitung, ähnlich wie bei den Hautextrakten, erfolgen. Ein Verseifen wie bei Nazzaro-Porro beschrieben (17), war zum Nachweis eines Tyrosinaseinhibitors in den Medien nicht notwendig. In dem Lipidmedium mit Ölsäure (Flüssigmedium A2) zeigte das nicht beimpfte Kontrollmedium eine ebenso starke Enzymhemmung wie die mit *Pityrosporum*-Hefen bewachsenen Medien, so daß hier die Hemmstoffbildung nicht Folge des Pilzwachstums sein konnte. Unter den allgemeinen Bedingungen der Schüttelkulturen mit hundertfünfzig Umdrehungen pro Minute und einundzwanzigtägiger Inkubation bei dreißig Grad Celsius, kam es hier in den Kontrollansätzen

des Ölsäuremediums spontan zur Bildung eines Tyrosinasehemmstoffes. In den Kulturmedien mit Olivenöl (Flüssigmedium A1) als Substrat zeigten die mit *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* bewachsenen Medien eine wesentlich stärkere Hemmung im Vergleich mit dem mitgeführten, nicht beimpften Kontrollmedium. Das Wachstum der *Pityrosporum*-Hefen hatte hier also einen Einfluß auf die Bildung eines Tyrosinasehemmstoffes. Da Olivenöl und Ölsäure als Reinsubstanzen keine Enzymhemmung zeigten, diese jedoch bei Azelain- und Pelargonsäure sehr deutlich ist, ist anzunehmen, daß unter Kulturbedingungen aus Ölsäure oxidativ spontan Azelainsäure und Pelargonsäure entsteht. In dem Lipidmedium mit Olivenöl (Flüssigmedium A1) als Substrat entsteht vermutlich erst durch die lipolytische Aktivität von *Pityrosporum orbiculare* und *pityrosporum ovale* Ölsäure, die dann spontan in die Bestandteile Azelainsäure und Pelargonsäure zerfällt. Die geringe Hemmung im Kontrollmedium bei Olivenöl ist unter den beschriebenen Kulturbedingungen als spontane Abspaltung von Pelargonsäure aus dem Ölsäuretriglycerid zu verstehen, aus dem dann ein Azelainsäuretriglycerid entstehen kann. Die erhöhte Konzentration von Tyrosinasehemmstoffen in mit *Pityrosporum*-Hefen befallener Haut wäre somit als Folge der lipolytischen Aktivität der *Pityrosporum*-stämme zu verstehen, die aus Triglyceriden entsprechende enzymhemmende Fettsäuren freisetzen. Diese scheinen im Stoffwechsel der Pilze keine weitere Verwendung zu finden. Darauf deutet das Ergebnis der Versuche mit dem modifizierten Lipid-Oranismens-Maintenance-Medium nach Weary (Flüssigmedium C) hin. Es wurde hier Hemmstoffextrakt aus gesunder Haut zu Beginn der Kultivierung in einer Konzentration zugefügt, daß die Extinktionszunahme beim nativ eingesetzten Medium nicht mehr als 0.04-0.06 E/min. in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion betrug. Nach einundzwanzigtägiger Kultivierung konnte der Hemmstoff im nativen Medium nicht mehr nachgewiesen werden,

so daß eine komplexe Bindung anzunehmen ist. Nach Auftrennung des Mediums konnte der Hemmstoff unverändert in gleicher Konzentration in der hydrophilen Fraktion nachgewiesen werden. Im Vergleich mit dem mitgeführten, nicht beimpften Kontrollmedium zeigten die mit *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* bewachsenen Medien keine Abnahme der Tyrosinasehemmung, so daß die Inhibitorkonzentration durch das Pilzwachstum unbeeinflusst geblieben war. Bei der Prüfung von Reinsubstanzen auf Tyrosinasehemmung zeigten gerade die kurzkettigen Carbonsäuren und besonders die Dicarbonsäuren eine Enzymhemmung. Zum Wachstum benötigten *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* jedoch langkettige Fettsäuren, kurzkettige können nicht verwertet werden (15,22). Da im Flüssigmedium C nach Kultivierung und Auftrennung die Hemmstoffkonzentration unverändert war, liegt der Schluß nahe, daß es sich hier um kurzkettige Lipide handelt. Nach eigenen Versuchen mit Azelainsäure wird diese von *Pityrosporum*-Hefen nicht zum Wachstum benötigt, sondern bewirkt in höheren Konzentrationen eine Wachstumshemmung. Das LOM-Medium nach Weary (Flüssigmedium B) zeigte auch nach Auftrennung keine wesentliche Enzymhemmung, obgleich Tween 80 Ölsäure enthält. Die Ursache dieser Diskrepanz zu den anderen Ergebnissen konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise ist der Hemmstoff in diesem Medium zu fest an das Detergenz gebunden und kann mit alleiniger Ätherextraktion nicht ausreichend davon gelöst werden beziehungsweise seine Konzentration liegt unterhalb der Nachweisgrenze. Für diese Annahme spricht, daß sowohl die bewachsenen Medien als auch das Kontrollmedium bei Beachtung des Kurvenverlaufes in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion eine sehr geringe Hemmwirkung vermuten lassen. Dies würde mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit Ölsäure als Lipidsubstrat (Flüssigmedium A2) übereinstim-

men.

Bei dem Vergleich der Tyrosinasehemmung von Haut- und Kulturfiltratextrakten mit Carbonsäuren, Dicarbonsäuren und Lipidsubstraten fielen geringe Unterschiede auf. Während bei Haut- und Kulturfiltratextrakten übereinstimmend ein gestreckter S-förmiger Kurvenverlauf in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion mit zunächst geringem, dann zunehmendem und schließlich wieder abnehmendem Extinktionsanstieg zu messen war, war bei den Reinsubstanzen eher eine lineare Hemmung festzustellen. Bei Azelainsäure ergab sich jedoch bei Messung über mehrere Minuten ebenfalls ein S-förmiger Kurvenverlauf (Abbildung 18). Ob diese unterschiedlichen Kurvenverläufe lediglich infolge von Konzentrationsunterschieden der Hemmstoffe oder infolge von Verunreinigung in den Extrakten auftraten, wurde nicht geklärt. Da der Kurvenverlauf bei einer mit Azelainsäure gesättigten Lösung ebenfalls S-förmig war (Abbildung 17), ist eher eine unterschiedliche Konzentration der Hemmstoffe anzunehmen.

Bei der Prüfung von Reinsubstanzen auf Tyrosinasehemmung war bei den Carbonsäuren von Buttersäure bis Laurinsäure und bei den Dicarbonsäuren von Bernsteinsäure bis Hexadecandisäure eine Tyrosinasehemmung nachweisbar. Die stärkste Tyrosinasehemmung ist in dem Bereich der kurzkettigen Carbonsäuren und besonders der Dicarbonsäuren mit einer Kohlenstoffatomzahl um neun anzunehmen. Im Vergleich zu den Carbonsäuren zeigten die Dicarbonsäuren in diesem Bereich eine wesentlich stärkere Tyrosinasehemmung. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Befunden von Nazzaro-Porro und Passi, die nur Tyrosinasehemmung für Dicarbonsäuren, insbesondere für Azelainsäure, beschrieben hatten (17). Es ist anzunehmen, daß bei dieser Arbeit die Säuren mit geringer Enzymhemmung, was besonders für die Carbonsäuren zutrifft, in der DOPA-Tyrosinase-Reaktion in zu geringer Konzentration vorgegeben wurden, so daß ihre Enzymhemmung nicht mehr nachweisbar war.

Der Fettmetabolismus der *Pityrosporum*-Hefen ist bisher noch nicht endgültig aufgeklärt. Für *Pityrosporum ovale* wird von Shifrine und Marr ein Bedarf an gesättigten Fettsäuren, insbesondere von Palmitinsäure und Myristinsäure für das Wachstum angegeben (22). Ein gutes Wachstum von *Pityrosporum orbiculare* wird von Nazzaro-Porro bei Palmitinsäure und Stearinsäure angegeben, wenn dem Lipidmedium neben 2 mg/ml Lipid zusätzlich 0,2 % Triton X-100 zugegeben wird. Unter diesen Bedingungen zeigt das Lipidmedium mit Ölsäure ein deutlich geringeres Wachstum von *Pityrosporum orbiculare*. Ohne Triton-X-100-Zusatz ist bei Ölsäure das beste Wachstum für *Pityrosporum orbiculare* angegeben. Diese Ergebnisse wurden so interpretiert, daß unter Triton-X-100-Zusatz die ungesättigten Fettsäuren möglicherweise durch eine Lösungsverbesserung toxische Konzentrationen erreichen (15). Die Löslichkeit der Lipide scheint jedenfalls ein wesentlicher Faktor für das Wachstum der *Pityrosporum*-Hefen *in vitro* zu sein. Ob sie für ihr Wachstum eher gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge um achtzehn Kohlenstoffatome benötigen, ist letztlich noch nicht geklärt. Setzt man eine höhere Affinität der *Pityrosporum*-Hefen zu langkettigen, gesättigten Fettsäuren voraus, so ergeben sich bei der Interpretation der Ergebnisse von Lipidanalysen aus *Pityriasis-versicolor*-Läsionen (14) interessante Aspekte. Hier ist eine relative Vermehrung von freien, ungesättigten Fettsäuren gegenüber freien gesättigten Fettsäuren beschrieben worden, während in der Fraktion der Triglyceride jede Fettsäure entsprechend ihrem prozentualen Anteil reduziert war. Speziell die einfach ungesättigten Fettsäuren mit sechzehn und achtzehn Kohlenstoffatomen waren vermehrt (4,14). Bei einer höheren Affinität von *Pityrosporum*-Hefen zu gesättigten Fettsäuren wäre dieses Ergebnis durch einen

relativ geringeren Bedarf an lipolytisch freigesetzten, ungesättigten Fettsäuren erklärbar. Es käme also nicht zu einer Bildung von ungesättigten Fettsäuren durch ein spezifisches Enzymsystem der *Pityrosporum*-Hefen, sondern lediglich zu einer relativen Zunahme der ungesättigten Fettsäuren, da die gesättigten Fettsäuren beim Wachstum der *Pityrosporum*-Hefen verbraucht werden. Zusätzlich zu der Freisetzung von kurzkettigen Fettsäuren, die bei der Tyrosinase eine Enzymhemmung bewirken und von den *Pityrosporum*-Hefen nicht weiter verstoffwechselt werden, käme in vivo, bei gleichzeitigem Angebot von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, noch ein relativ vermehrter Anfall von ungesättigten Fettsäuren hinzu. Von diesen kann ein Teil wieder spontan oxidativ zu Dicarbonsäuren und Carbonsäuren zerfallen. Diese Fettsäuren können dann eine weitere Enzymhemmung der Tyrosinase bewirken. Die Depigmentierung bei Pityriasis versicolor wäre somit nicht Folge der Bildung eines neuen, für *Pityrosporum*-Hefen spezifischen Hemmstoffes, sondern lediglich Folge des Überwiegens inhibierender Lipide, die auch in nicht erkrankter Haut zu finden sind. Dabei könnte noch die elektronenmikroskopisch festgestellte Erweiterung der Interzelluläräume bei Pityriasis versicolor zu einer stärkeren Wirkung dieser Lipide auf die Melanozyten führen (1,5,11). In vivo und in vitro war der Hemmstoff primär komplex gebunden und konnte erst nach Ätherextraktion nachgewiesen werden. In einem nicht reproduzierbaren Versuch fiel nach einundzwanzigtägiger Kultivierung in einem mit *Pityrosporum* ovale bewachsenen Lipidmedium, dem lediglich aus Hautschuppen extrahierte Lipide als Substrat zugefügt waren, direkt im nativen Medium eine Tyrosinasehemmung auf. Möglicherweise sind in dieser Kultur die bindenden Lipide von *Pityrosporum* ovale vollständig verstoffwechselt worden, so daß der Hemmstoff ohne Abtrennung hydrophober Anteile direkt im Nativmedium nachweisbar wurde. Eine weitere Analyse der Lipide aus Hautextrakten und Kulturmedien mittels einer Dünnschichtchroma-

tographie ist zu weiteren Klärung notwendig.

Zwischen *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* ergaben sich bei den durchgeführten Versuchen keine Unterschiede. Durch ihre lipolytische Aktivität kam es bei beiden im Lipidmedium mit Olivenöl (Flüssigmedium A1) zu einer Zunahme an Tyrosinasehemmstoffen. Dimorphe Wachstumsformen mit gleichzeitigem Vorliegen von Hefezellen und Hyphen waren bei *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* in den verwandten Kulturmedien nicht feststellbar, sondern ausschließlich die Hefephase. *Pityrosporum ovale* wächst in vivo an normaler Haut, in Schuppen der Kopfhaut, bei seborrhoischem Ekzem, bei bestimmten Formen der Follikulitis oder in Komedonen bei Akne immer in der Hefezellform (7). Bei *Pityriasis versicolor* liegt *Pityrosporum orbiculare* immer dimorph mit Hefezellen und Hyphen vor, an normaler Haut ausschließlich als Hefe (7). In vitro gelingt es in definierten Kulturmedien bei *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* die Bildung von Pilzhypen zu induzieren (6,16). Nach den bisher bekannten Untersuchungen und auch nach den Ergebnissen der eigenen Versuche scheint kein signifikanter, spezialstypisierender Unterschied zwischen *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* zu bestehen. Es ist daher anzunehmen, daß *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* nur unterschiedliche Ausdrucksformen derselben Art sind. Ein saprophytäres Stadium der *Pityrosporum*-Hefen ist auf normaler Haut anzunehmen. Unter bestimmten Bedingungen scheint sich hieraus ein parasitäres Stadium zu entwickeln, wobei einerseits zum Beispiel bei Follikulitis die sporenförmige Gestalt persistiert und andererseits bei *Pityriasis versicolor* eine dimorphe Phase mit Hefezellen und Hyphen entsteht. Unter welchen Voraussetzungen unterschiedliche Krankheitsbilder durch *Pityrosporum*-Hefen verursacht wer-

den, ist noch nicht geklärt. Grundsätzlich scheinen hierfür eher wirtseigentümliche, denn erregereigentümliche Faktoren bedeutsam. Bei Pityriasis versicolor sind neben anderen Faktoren zum Beispiel auch eine Abwehrschwäche des Wirts bei Morbus Cushing oder unter Cortisontherapie für die Entstehung des Krankheitsbildes zu berücksichtigen (1,8). Letztlich sind in der Pathogenese, das heißt dem Virulenz-Resistenz-Problem bei den Pityrosporen noch viele Fragen offen, so daß wir uns derzeit noch kein vollständiges Bild machen können. Inwieweit die in vitro nachzuweisende Tyrosinasehemmung der kurzkettigen Carbonsäuren und Dicarbonsäuren in vivo, angesichts der geringen dort vorkommenden Konzentrationen, tatsächlich eine entsprechende Wirkung zeigen, beziehungsweise die bei Pityriasis versicolor häufige Hypopigmentierung verursachen, bedarf weiterer Untersuchungen. Nazzaro-Porro et al. haben aus der in-vitro-Hemmung der DOPA-Tyrosinase-Reaktion mit Azelainsäure ein therapeutisches Prinzip zur Behandlung von Hyperpigmentierungen und melanozytenreichen Tumoren abgeleitet und in Pilotuntersuchungen auch klinisch effektive Wirksamkeit von Azelainsäure nach lokaler Applikation beschrieben (18). Allerdings ist nach neueren Untersuchungen von Pathak et al. die Wirkung von Azelainsäure als Depigmentierungsmittel in vivo und ihre günstige Beeinflussung des B-16-Mäusemelanoms wieder in Frage gestellt worden (19).

ZUSAMMENFASSUNG

Die Beeinflussung der DOPA-Tyrosinase-Reaktion in vitro durch Hautschuppenextrakte von Patienten mit Pityriasis versicolor und von Normalpersonen sowie durch Extrakte aus Kulturmedien, die mit Pityrosporum orbiculare oder Pityrosporum ovale bewachsen waren, wurde geprüft. Vergleichend dazu wurden chemisch definierte Lipide auf eine mögliche Beeinflussung der DOPA-Tyrosinase-Reaktion hin untersucht.

I. Extrakte aus Hautschuppen von Pityriasis-versicolor-Läsionen hemmen in vitro die DOPA-Tyrosinase-Reaktion stärker, als die aus nicht erkrankter Haut.

II. Die aus menschlicher Haut gewonnenen Hemmstoffe sind primär komplex gebunden und zeigen erst nach Ätherextraktion und Abtrennung hydrophober Lipide in vitro eine Tyrosinasehemmung.

III. Die aus Kulturmedien extrahierbaren Hemmstoffe zeigen ebenfalls erst nach Abtrennung hydrophober Lipide in vitro eine Enzymhemmung.

IV. Pityrosporum orbiculare und Pityrosporum ovale verhalten sich unter den beschriebenen Kulturbedingungen hinsichtlich der Bildung eines Tyrosinaseinhibitors identisch. Ein unterscheidendes Stoffwechselmerkmal konnte nicht gefunden werden.

V. Carbonsäuren zeigten bis zu einer Kettenlänge von zwölf Kohlenstoffatomen (Laurinsäure) in vitro eine Tyrosinasehemmung. Die stärkste Enzymhemmung war bei Pelargonsäure mit neun Kohlenstoffatomen festzustellen.

VI. Dicarbonsäuren hemmten die DOPA-Tyrosinase-Reaktion bis zu einer Kohlenstoffatomzahl von sechzehn. Bei Azelainsäure mit neun Kohlenstoffatomen und Tridecandisäure mit dreizehn Kohlenstoffatomen wurde die stärkste Enzymhemmung gemessen, die im Vergleich zu den Carbonsäuren mit gleicher Kettenlänge wesentlich stärker war.

VII. Durch ihre lipolytische Aktivität setzten *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* enzymhemmende, kurzkettige Fettsäuren frei, die sie nicht verstoffwechseln. Zusätzlich entstehen enzymhemmende Dicarbonsäuren und Carbonsäuren über die Freisetzung von langkettigen, ungesättigten Carbonsäuren durch die *Pityrosporum*-Hefen, die unter Kulturbedingungen spontan in kurzkettige Carbonsäuren und Dicarbonsäuren zerfallen.

VIII. Eine stärkere Affinität der *Pityrosporum*-Hefen zu langkettigen, gesättigten Fettsäuren vorausgesetzt, kann der erhöhte Anteil von ungesättigten, langkettigen Fettsäuren in *Pityriasis-versicolor*-Läsionen als ein verminderter Verbrauch bei vermehrter Freisetzung derselben verstanden werden. In vivo käme zu der unter VII. beschreibenden Hemmstoffbildung noch der Summationseffekt der vermehrt anfallenden, ungesättigten Fettsäuren.

LITERATURHINWEISE

1. Avram, A.
Le Pityriasis versicolor
Cilag Chimie France, Paris 1977
2. Bojanosky, A., Bohnert E., Jung E.G.
Pityrosporum orbiculare: Erreger verschiedener
klinischer Bilder und Modell einer Depigmentierungsart.
Akt./Dermatol. 5, 19-25, 1979
3. Burke, R.C.
Tinea versicolor. Susceptibility factors and
experimental infection in human beings.
J. Invest. Dermatol. 36, 389-402, 1961.
4. Burke, R.C.
Investigations in tinea versicolor.
Lipid and amino-acid studies.
Yale J. Biol. Med. 35, 206-221, 1962/63.
5. Charles, C.R., Sire, D.J., Johnson, B.L., Beidler, J.G.
Hypopigmentation in tinea versicolor. A histochemical
and electronmicroscopie study.
In. J. Dermatol. 12, 48-58, 1973
6. Dorn, M., Roehnert, K.
Dimorphism of Pityrosporum orbiculare in a defined
culture medium.
J. Invest. Derm. 69 (1977) 244-248.
7. Dorn, M.
Pityriasis versicolor und Pityrosporum orbiculare:
Mykologische Untersuchungen zur Erregercharakterisie-
rung. Habilitationsschrift, München 1982.

8. Fitzpatrick, Th. B., Szabó, G., Seiji, M., Quevedo, W.C.
Biology of the melanin pigmentary system.
In: *Dermatology in General Medicine*
(Hrsg.: Th. B. Fitzpatrick, A.Z. Eisen, K. Wolff,
J.M. Freedberg, K.F. Austen). S. 131-163.
McGraw-Hill: New York 1979
9. Gordon, M.A.
Lipophilic yeastlike organisms associated with
tine versicolor.
J. Invest. Dermatol. 17, 267-272, 1951
10. Gordon, M.A.
The lipophilic mycoflora of the skin
In vitro culture of *Pityrosporum orbiculare*. n. sp.
Mycologia 43, 524-535, 1951
11. Grupper, C., Cesarini, J.P., Prunieras, M.
Pityriasis versicolor achromiant. Etude ultra-
structurale. Note préliminaire à propo de trois
cas. Bull. Soc. Franc. Derm. Syph. 82, 114-117, 1975
12. Marples, R.R., Downing, D.T., Kligman, A.M.
Influence of *Pityrosporum* species in the generation
of free fatty acids in human surface lipids.
J. Invest. Dermatol. 58, 155-159, 1972
13. Jung, E.G., Bohnert, E.
Mechanism of depigmentation in *pityriasis versicolor*
alba (Pva)
Arch. Dermatol. Res. 256, 333-334, 1976

14. Nazzaro-Porro, M., Caprilli, F., Passi, S., Bonifortit, L., Loreti, P.
Attivita' lipolitica del *Pityrosporum orbiculare* in vitro in vivo.
Boll. Ist. Dermatol. S. Gallicano 8, 215-240, 1973
15. Nazzaro-Porro, M., Passi, S., Caprilli, F., Nazzarro P., Morpurgo, G.
Growth requirements and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*.
J. Invest. Dermatol. 66, 178-182, 1976.
16. Nazzaro-Porro, M., Passi, S., Caprilli, F., Mercantini, R.
Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters.
J. Invest. Dermatol. 69, 531-534, 1977
17. Nazzaro-Porro, M., Passi, S.,
Identification of tyrosinase inhibitors in cultures of *Pityrosporum*.
J. Invest. Dermatol. 71, 205-208, 1978.
18. Nazzaro-Porro, M., Passi, S., Morpurgo, G., Breathnach, A.S.
Effect of dicarboxylic acid on Harding-Passey melanome.
J. Invest. Dermatol. 70, 235, 1978
19. Pathak, M.A., Wick, M., Farinelli, W., Fitzpatrick, T.B.
Evaluation of azelaic acid on normal skin pigmentation and on the B-16 mouse melanoma.
Abstr. Joint meeting. The Society for Investigative Dermatology and the European Society for Dermatological research, Amsterdam, Netherlands, June 1979

20. Rongone, E.L.
Cutaneous Metabolism. In: Dermatotoxicology and Pharmacology.
(Hrsg.: F.N. Marzulli, H.J. Maibach).
S. 93-137, Hemisphere Publ.: Washington, London 1977
21. Schaaf, F.
Probleme dermatologischer Grundlagenforschung.
Dr. Alfred Hüthig Verl.: Heidelberg, 171-191, 1970
22. Shifrine, M., Marr, A.G.
The requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale*.
J. of Gen. Microbiol. 32, 263-270, 1963
23. Weary, P.E.
Comedogenic potential of the lipid extract of
pityrosporum ovale.
Arch. Dermatol. 102, 84-91, 1970
24. Wilde, P.F., Stewart, P.S.
A. study of the fatty acid metabolism of the yeast
Pityrosporum ovale.
Biochemical J. 108, 225-231, 1968

LEBENS LAUF

Am 24.10.1951 als einziges Kind des selbständigen Textilkaufmannes Richard Scheck und seiner Ehefrau Anna Scheck, geborene Pribil, wurde ich, Gerhard Scheck, in Stuttgart geboren.

Ostern 1958	Einschulung in der Volksschule in Fellbach-Schmidn bei Stuttgart.
Ostern 1960	Wechsel in die Freie Waldorfschule in Stuttgart.
Juni 1970	Reifeprüfung an der Freien Waldorfschule in Stuttgart.
Wintersemester 70/71 - Wintersemester 72/73	Biologiestudium an der Universität Stuttgart-Hohenheim.
März 1973 - Juni 1974	Zivildienst.
Wintersemester 74/75 - Wintersemester 75/76	Medizinstudium an der FU-Berlin.
Sommersemester 76 - Wintersemester 79/80	Medizinstudium an der LMU-München.
16. Juni 1980	Approbation.
Seit Oktober 1980	Weiterbildung im Fach Innere Medizin mit Schwerpunkt Gastroenterologie an der Medizinischen Klinik Bad Cannstatt bei Professor Dr. med. K. Heinkel und Chefarzt Dr. med. habil. U. von Gaisberg.

